Aus dem Max-Planck-Institut für Immunbiologie
Freiburg
Arbeitsgruppe Professor Dr. G.H.M. Gottschewski
und dem
Institut für Anatomie
Arbeitsgruppe Professor Dr. med. H.-J. Merker
des Fachbereichs Natur- und sozialwissenschaftliche
Grundlagenmedizin und medizinische Ökologie der
Freien Universität Berlin

EXPERIMENTELLE UNTERSUCHUNGEN ÜBER DEN PROTEINÜBERTRITT VON DER MUTTER ZUM EMBRYO WÄHREND DER FRÜHEN EMBRYOGENESE DES GOLDHAMSTERS (Cricetus aureatus Waterhouse)

INAUGURAL-DISSERTATION
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Ulrich Scherler
aus
Dessau
1985

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547201_0058

Aus dem Max-Planck-Institut für Immunbiologie
Freiburg
Arbeitsgruppe Professor Dr. G.H.M. Gottschewski
und dem
Institut für Anatomie
Arbeitsgruppe Professor Dr. med. H.-J. Merker
des Fachbereichs Natur- und sozialwissenschaftliche
Grundlagenmedizin und medizinische Ökologie der
Freien Universität Berlin

EXPERIMENTELLE UNTERSUCHUNGEN ÜBER DEN PROTEINÜBERTRITT VON DER MUTTER ZUM EMBRYO WÄHREND DER FRÜHEN EMBRYOGENESE DES GOLDHAMSTERS (Cricetus aureatus Waterhouse)

Inaugural - Dissertation

zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Ulrich Scherler

aus

Dessau

Referent: Prof. Dr. med. H.-J. Merker

Korreferent: Prof. Dr. W. Reutter

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen
Fachbereiche der Freien Universität Berlin.

Promoviert am: 8.3.85

INHALTSVERZEICHNIS

I.	THEMENSTELLUNG	1
II.	MATERIAL UND METHODEN	4
	1. Verfahren zur Kopplung von FITC und EW	4
	2. Histologische Methoden	6
	3. Narkose	7
	4. Photographie	7
III.	BEFUNDE	9
	Teil I: MORPHOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN	9
	A. TUBENKEIM UND NICHT IMPLANTIERTER UTERUSKEIM	9
	B. DER ZEITRAUM DER IMPLANTATION	10
	1. Der Implantationsvorgang	10
	2. Differenzierung der Inneren Zellmasse	12
	3. Der Ektoplazentarkonus	13
	4. Die Reichert'sche Membran	14
	C. ZEITRAUM NACH DER IMPLANTATION BIS ZUR BILDUNG DEFINITIVER KEIMESHÖHLEN	15
	1. Vollzogene Implantation; Deciduahöhle	15
	2. Die primitiven Keimeshöhlen	16
	3. Ektoplazentarkonus	18
	D. BILDUNG DER DEFINITIVEN KEIMESHÖHLEN	20

E. KURZE DARSTELLUNG DER ORGANOGENESE 22

1. Praesomiten-Stadium 22
2. Somiten-Stadium 22

Teil II: ENTWICKLUNGSPHYSIOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN 25

A. SPEZIELLE METHODEN UND ERGEBNISSE 25

1. Versuchsgruppe A 25
2. Versuchsgruppe B 25
3. Versuchsgruppe C 25

B. KONTROLLEN 33

IV. DISKUSSION 35

1. Zur Methode 35
2. Ergebnisse 40

V. ZUSAMMENFASSUNG 43a

VI. LITERATUR 44

VII. ABBILDUNGEN 51

I. THEMENSTELLUNG

Seit Ehrlichs (1892) klassischen Versuchen über den Austausch von Makromolekülen zwischen Mutter und Foet haben sich zahlreiche Untersuchungen mit der Frage der intrauterinen und postnatalen Proteinpassage befaßt. Es stehen dabei im Vordergrund die Probleme

- der Obertragung der Immunität
- der Infektion und Intoxikation des ungeborenen Kindes
- und stoffwechselphysiologische Gesichtspunkte.

Der Ort des Obertrittes von solchen Makromolekülen muß beim Menschen in der Placenta lokalisiert werden.

Brambell (1966) hatte jedoch 1954 beim Kaninchen nachgewiesen, daß nicht die Plazenta, sondern in erster Linie die Fruchthüllen - parietale und viscerale Dottersackwand - als das für den Prozeß der Proteinpassage verantwortliche Organ anzusehen sind. Seither konnte gezeigt werden, daß bei den Rodentia die Dottersackwand, die im Gegensatz zu anderen Species, besonders den Primaten, den Keim zur Mutter hin abschirmt, ein resorbierendes Organ darstellt. Der Obertritt von Substanzen, auch von Makromolekülen an dieser Stelle, ist durch viele Untersuchungen dokumentiert. Darüberhinaus weisen teratologische Experimente auf die Wichtigkeit dieser resorbierenden Schicht für die normale Entwicklung hin. Durch Substanzen, die die endocytotische Funktion stören, z.B. Trypanblau, lassen sich Mißbildungen auslösen

(Beck et al., 1967; Beck, 1979; Brown and Segal, 1977; Davis and Sauter, 1977; Duncan and Lloyd, 1978; Duncan et al., 1979; Franke et al., 1977; Freeman and Lloyd, 1980; Gulamhusein, 1981; Huxham and Beck, 1981; Ibbotson and Williams, 1979; Livesey et al., 1980; Livesey and Williams, 1979; Livesey and Williams, 1981; Padykula et al., 1966; Roberts et al., 1977; Roberts et al., 1980; Thornburg and Faber, 1977, 1979; Williams, 1978). Der größte Teil der Arbeiten zu diesem Thema beschäftigt sich jedoch mit den Verhältnissen in der zweiten Hälfte der Schwangerschaft, in der die Plazenta ausgebildet, die viscerale Dottersackwand vaskularisiert ist und die Zellen des Dottersackentoderms die Ultrastruktur proteinresorbierender Zellen besitzen:

> . . . a superficial system . . . directly involved in the uptake of macromolekules, such as antibodies and other proteins (Padykula et al., 1966).

Lambson (1966) konnte zeigen, daß bei der Ratte die Entodermzellen der Dottersackwand die Fähigkeit zur Eiweißaufnahme erst um den 10. Tag erwerben.

Gottschewski und Zimmermann (1961), Gottschewski et al., (1962), Zimmermann (1965) und Zimmermann (1966) veröffentlichten eine Reihe von Untersuchungen, in denen sie sich mit dem Verhalten früherer Keime beschäftigen. Sie weisen beim Kaninchen eine für Makromoleküle "offene Phase" nach: In der Zeit zwischen 7 1/2 und 8 1/2 bis 9 - also noch während der Implantation - kommt es zu einem ausge-

prägten Einstrom mütterlicher Serumproteine in die Dottersackhöhle. Die Proteinkonzentration der Dottersackhöhlen-Flüssigkeit erreicht in dieser Zeitspanne Werte, die mit den Werten des mütterlichen Serums nahezu identisch sind. In der elektrophoretischen Trennung der Flüssigkeit lassen sich keine Anzeichen einer Protein-Selektion erkennen. Zimmermann (1965) zeigte weiter - unter Verwendung von Fluorescenzsera -, daß nur die Trophoblastzellen diesen Proteinübertritt vermitteln. Entoderm und Ektoderm nehmen kein Eiweiß auf. Diese Ergebnisse beim Kaninchen liegen dieser Arbeit als Fragestellung zugrunde: Kommt es beim Goldhamster zu einer vergleichbaren "offenen Phase", und welche Zellgruppen nehmen in der frühen Embryogenese mütterliche Proteine auf ? Eine Bestätigung dieser Befunde, auch bei anderen Species, würde dieser Situation eine allgemeinere Bedeutung zukommen lassen. Goldhamster erlauben keine Manipulationen wie etwa die Punktion embryonaler Höhlen. Für die histologische Verfolgung von Proteinen bietet sich als Methode der Wahl die Markierung der Eiweißmoleküle mit Fluorescenzfarbstoffen an. Durch die Markierung der Proteine verändern sich deren biologische und physikalische Eigenschaften nicht oder nur geringfügig (Mayersbach, 1957, 1958; Schiller et al., 1953). Auch bei lang andauernden Versuchen kommt es nicht zu merkbarer Dissoziation der Eiweiß-Farbstoff-Verbindung (Schiller et al., 1953).

II. MATERIAL UND METHODEN

Tiere: Goldhamster aus der Zucht des Institutes, die in Einzelkäfigen in hellen, sauberen Räumen aufgezogen werden.

Raumtemperatur: 23° C ± 2° C.

Tages- bzw. Nachtlänge bei künstlicher Beleuchtung: je 12 Stunden.

Altersangaben: in dpo = Tage nach der Ovulation, die durchschnittlich 1 Uhr nachts (Ward, 1948) erfolgt.

1. Verfahren zur Kopplung von Fluorescenzfarbstoff und Eiweiß (Riggs et al., 1958)

Farbstoff: Fluoresceinisothiocyanat (Serva), FITC.
Protein: Rinder-Vollserum

In einem Erlenmeyer werden gemischt:

10 ml 0,85 % NaCl
3 ml Carbonat-Bicarbonat-Puffer (0,5m; ph 9)
2 ml Aceton; trocken.

Nach der Kühlung auf ca. 0 Grad C werden diesem Gemisch hinzugefügt:

10 ml Rinder-Vollserum 0° C
30 mg FITC, gelöst in 1,5 ml Aceton (trocken)
entspricht 0,05 mg FITC/1 mg Protein.

Das Gesamtgemisch wird ca. 24 h bei 0 - 4° C gerührt.

FITC wurde im Oberschuß hinzugefügt. Der nicht an Eiweiß fixierte Teil des Farbstoffes ist im Gemisch noch als freies, gelöstes FITC enthalten und würde sich im Gewebe unspezifisch verhalten, das heißt, er würde durch sein vom Eiweiß verschiedenes Diffusions-, Absorptions-, Resorptions- usw. -verhalten die Ergebnisse stark verfälschen. Zur Elimination dieses unspezifischen Färbevermögens und zur Beseitigung eventuell denaturierter Proteine wurden dem Kopplungsverfahren folgende Reinigungsmethoden angeschlossen:

1. Beseitigung des unspezifischen Färbevermögens:
   a. Dialyse gegen 0,85 % NaCl und abschließend gegen Hank'sche Lösung, bis in der Dialyseflüssigkeit keine Fluorescenz mehr nachzuweisen ist (ca. 2 Tage).
   b. Schütteln des Fluorescenz-Serums in Aktiv-Kohle-Pulver (ca. 1 h) (Chadwick et al., 1960).

2. Elimination von Protein-Protein-Interaktionsvalenzen: Schütteln des Fluorescenz-Serums in Aceton-extrahiertem Leber-Nieren-Pulver (ca. 1/2 h).

3. Abschließend Filtrierung durch Kohlefilter, um eventuell denaturiertes Eiweiß und Kohleteilchen aus dem Serum zu beseitigen.

Das so gereinigte, mit FITC markierte Serum wurde in 1 ml-Röhrchen eingefroren und bei -30° C konserviert.

2. Histologische Methoden

Das Verfahren der histologischen Präparation muß folgende Bedingungen erfüllen:

Einmal darf die spezifische Fluorescenz des markierten Eiweißes nicht verloren gehen oder abgeschwächt werden. Außerdem darf diese histologische Methode die schwache Eigenfluorescenz des Gewebes nicht verstärken.
Zum zweiten verbieten sich Methoden, bei denen es zur Dissoziation der Eiweiß-Farbstoff-Verbindung kommt.

Fixierung: Gesättigte wässrige $HgCl_2$-Lösung, 20-30 min.
Entwässerung: Alkoholreihe 40 %, 1h; 70 % 2h; 85 %, 2h; 96 %, 2h; 100 %, 3h; 100 %, 3h.
Reinigungs- und Vermittlungsmedium: Xylol, 3h; 2h; 1h.
Einbettung: Paraffin oder Paraplast.
Schnittdicke: 8-15 °; diese relativ große Schnittdicke gewährleistet eine ausreichende Fluorescenzintensität.

Die histologischen Schnitte wurden bei 40° C gestreckt, in Xylol entparaffinisiert und in einem nicht fluorescierendem Medium (Entellan) eingedeckelt. Auf das Herauslösen des präzipierten Hg wurde verzichtet.

Nach der photographischen Dokumentation der Präparate im UV-Licht wurden die Deckgläser ausgewählter Präparate

in Xylol entfernt und die Schnitte in einer Hämalaun-Eosin-Färbereihe angefärbt. Dieses Verfahren ermöglicht den direkten Vergleich der Bilder eines Präparates im UV-Licht mit denen im Normallicht, was die Benennung fluorescierender Strukturen wesentlich erleichtert.
Diese HE-Präparate wurden für die morphologischen Untersuchungen verwendet.

3. Narkose

Als Narkotika wurden Äther und Thiogenal verwendet: Äther als kurze Vornarkose, während der die i.p.-Injektion von 0,8 mg Thiogenal pro 100 gr Körpergewicht vorgenommen wurde.

4. Photographie

Mikroskop : Zeiss, "Großes Forschungsmikroskop"
UV-Filter : 53;51;47; (Zeiss)
UV-Lampe : Osram HB 200
Filme : Agfa Isopan IF; 17 Din
Entwickler: Neofin

Das Emissionsmaximum des FITC liegt bei 550 µ. Diese gelbgrüne Farbe grenzt sich deutlich ab von den Eigenfluorescenzen im Gewebe: nicht markiertes Eiweiß zeigt

im allgemeinen eine bläuliche, Hämoglobin eine rötliche Fluorescenzfärbung. Diese Eigenfluorescenzen des Gewebes dokumentieren sich in der Schwarz-Weiß-Photographie entsprechend ihrer Intensität als mehr oder weniger helle Grauwerte; sie stellen die matte Grundhelligkeit der Photographien dar, von der sich die Fluorescenz des FITC durch ihre "Brillanz" abhebt (Abb. 1).

Es wurde ein automatischer Belichtungsmesser verwendet. Die leichte Inkonstanz der Belichtungszeiten, bedingt durch den Meßcharakter des Gerätes (vorwiegende Intensitätsmessung im Zentralbereich des Bildes), verursachte die geringen Helligkeitsdifferenzen zwischen einzelnen Aufnahmen.

5. Über "spezielle Methoden" wird im Teil II der Befund im einzelnen berichtet.

III. BEFUNDE

Teil I: MORPHOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN

Der zeitliche Schwerpunkt der morphologischen Untersuchungen liegt zwischen 3 und 8 Tagen nach der Ovulation (dpo). Er entspricht dem der entwicklungsphysiologischen Untersuchungen, die im Teil II dargestellt werden und soll die Voraussetzungen für die morphologische Orientierung im Teil II, Entwicklungsphysiologische Untersuchungen, schaffen.

A. TUBENKEIM UND NICHT IMPLANTIERTER UTERUSKEIM

In der Nacht zwischen dem 1. und 2. Tag des 4-tägigen Genitalzyklus ist das Hamsterweibchen oestrisch. Nur während dieser Zeit akzeptiert es die Begattung durch das Männchen. Zur Ovulation kommt es gegen 1 Uhr nachts (Ward, 1948); nach diesem Zeitpunkt richten sich die hier verwendeten Altersangaben. Die Begattungen erfolgten immer vor dem Ovulationszeitpunkt (zw. 20-22 Uhr), so daß unter dieser Bedingung Ovulations- und Imprägnationstermin zeitlich identisch werden.

Während der Passage durch die Tube vollzieht der Keim zwei Teilungen: etwa 20 h nach der Befruchtung die erste, ca. 25 h danach die zweite, die zur 4-Zell-Morula führt. Dieses Stadium dauert etwa 12 h. Zur dritten Teilung kommt es in der Regel erst beim oder nach dem Über-

tritt der Morula in das Uteruslumen (ca. 3 dpo), (Graves, 1945; Venable, 1946; Ward, 1948; Hamilton, Samuel, 1956).

Zu Beginn des 4. Tages po liegt die etwa 12-zellige Morula frei im Uteruslumen. Im Zentrum einer solchen Morula (durchschnittlich 7 pro Weibchen) entsteht mit der Konflusion diffuser interzellulärer Flüssigkeitsansammlungen die Blastocystenhöhle, die mit ihrer Vergrößerung die Innere Zellmasse (8-9 Zellen) innen von der flachen Trophoblastzellschicht (3-4 Zellen) trennt (Abb. 1). Die Trophoblastzellschicht stellt die äußere zelluläre Begrenzung der Blastocyste dar (sie setzt sich als Raubersche Deckschicht auch außen auf die Zellen der Inneren Zellmasse fort). Dem Trophoblasten liegt 3 dpo bis 3 1/4 dpo die Membrana pellucida noch vollständig auf.

B. DER ZEITRAUM DER IMPLANTATION (4dpo-4 1/2dpo)

1. Der Implantationsvorgang

Wenige Stunden später, etwa 3 1/2 dpo, ist die Membrana pellucida verschwunden. Der Umfang der Blastocyste hat sich erweitert, wobei die Blastocystenhöhle jetzt im Verhältnis zur Zellmasse das größte Volumen einnimmt. In diesem Zeitraum verschiebt sich die Rate der Zellproliferation zugunsten des Trophoblasten, nachdem bis ca. 3 dpo in erster Linie Zellen der Inneren Zellmasse entstanden waren. Schenk rechnet bei einer 17-Zell-

Blastocyste 8 Zellen dem Trophoblasten zu, 9 der Inneren Zellmasse (Schenk, 1957). Eigene Zählungen am Beispiel einer 30-Zell-Blastocyste: 18 Trophoblastzellen und 12 Zellen der Inneren Zellmasse. Kriterien für die entsprechende Zuordnung waren der chromatinreichere Kern der Trophoblastzellen und deren periphere Lage.

3 1/2 dpo liegen die Blastocysten nicht mehr wahllos über das Uteruslumen verteilt, sondern ausnahmslos in antimesometralen Krypten des Lumens (Abb. 2). Auch innerhalb dieser Krypten ist ihre Ausrichtung regelrecht: Der embryonale Pol mit der Inneren Zellmasse (außen weiterhin bedeckt mit flachen Trophoblastzellen) weist nach mesometral, während antimesometral die Zellen des abembryonalen Poles (Trophoblast) beginnen, mit der Uterusschleimhaut Kontakt aufzunehmen.

Ausdruck dieser beginnenden Kontaktaufnahme ist der zügige Differenzierungsprozeß der abembryonalen Trophoblastzellen: Kern und Cytoplasma hypertrophieren, es entstehen Riesenzellen; Cytoplasmafortsätze weisen in die Richtung des angrenzenden Uterusepithels (Abb. 3,4).

Auch das Uterusepithel der Implantationskrypte zeigt charakteristische Veränderungen: Die Zellen sind hochprismatisch hypertrophiert; das Cytoplasma ist aufgelockert und oligochromatisch; die Kernstellungen und -formen variieren stark (Abb. 4).

4 1/2 dpo hat bei allen daraufhin untersuchten Blastocysten die invasive Tätigkeit von abembryonalen Trophoblast-Riesenzellen begonnen (Abb. 4,5). Die Riesenzellen lösen sich teilweise aus dem engen Verband des Trophoblasten, dringen mit ausgedehnten Cytoplasmafortsätzen zwischen Unterusepithel und Basalmembran und lösen das Epithel von seiner bindegewebigen Grundlage (Abb. 4,5,6). Gleichzeitig zeigen das Epithel und die Decidua im Bereich der Implantationsstelle das morphologische Bild eines degenerativen Prozesses, auch ohne daß es zum lichtmikroskopisch sichtbaren Kontakt mit der Blastocyste gekommen ist (Abb. 4,5).

Nach der Zerstörung der Basalmembran an einer oder mehreren Stellen dringen Riesenzellen antimesometral und seitlich in die Decidua ein und arrondieren einen Raum, der nur von decidualem Gewebe begrenzt wird: die Decidualhöhle. Mesometral vom embryonalen Pol der Blastocyste wird die Verbindung der Decidualhöhle zum Uteruslumen durch eine bindegewebige Brücke verschlossen (Abb. 8).

2. Differenzierung der Inneren Zellmasse

Mit dem Implantationsvorgang beginnt gleichzeitig die zügige Zellproliferation der Inneren Zellmasse, die mit deren Differenzierung zum Entoderm und Ektoderm einhergeht.
Während sich 3 1/2 dpo die Innere Zellmasse noch als schmaler Zellhaufen darstellt, füllt sie 4 1/2 dpo -

5 dpo den Raum der ehemaligen Blastocystenhöhle nahezu vollständig aus (Abb. 5,6);
durch die Zellproliferation in die Blastocystenhöhle ist es zur Keimblattumkehr (embolic invagination) gekommen.

Entoderm und Ektoderm lassen sich 4 1/2 dpo klar voneinander abgrenzen (Abb. 5,6): Das Entoderm liegt als kubische einschichtige Reihe schwach eosinophiler Zellen der ventralen und ventro-lateralen Fläche der kubischen, vorwiegend einschichtigen Zellreihe des Ektoderms an. Das Cytoplasma der Ektodermzellen grenzt sich durch die kräftige Eosinophilie deutlich vom Cytoplasma der entodermalen Zellen ab.
In der Richtung des abembryonalen Pols setzt sich das Ektoderm über das seitliche Niveau der Entodermzellreihe hinaus fort und geht am abembryonalen Pol in die Zellgruppe des nicht zu Riesenzellen differenzierten Trophoblasten über.

3. Der Ektoplazentarkonus

Eine abgegrenzte Trophoblast-Zellgruppe hat etwa die Form eines Kegels und sitzt dem Ektoderm und Entoderm kappenförmig auf; sie trägt die Bezeichnung Ektoplazentarkonus (oder Träger). Von diesem Konus aus proliferieren mehrschichtige Trophoblastzellstränge nach lateral und ventrolateral in Richtung des seitlichen Kryptenepithels. In Riesenzellen umgewandelte Zellen

dieser Stränge zerstören an einigen Stellen das Epithel und dessen Basalmembran und dringen kurze Zeit später in die Decidua ein (Abb. 5,6). Am abembryonalen Pol ist der Differenzierungsvorgang der Trophoblastzellen zu Riesenzellen schon kurz nach dem Beginn der Implantation abgeschlossen. Da diese Zellen mit der Differenzierung ihre Teilungsfähigkeit verlieren (Ward, 1954), wird der am embryonalen Pol gelegene Ektoplazentarkonus mit der Implantation zum Keimgewebe für Trophoblast-Riesenzellen; während der weiteren Embryogenese bleiben die kleinen Trophoblastzellen im Zentrum des Konus teilungsfähig (Abb. 11,12).

4. Die Reichert'sche Membran

Riesenzellen, die am abembryonalen Pol und an den Seiten des Keimes entstanden sind, verlassen teilweise im Verlaufe der Implantation den Verband der Riesenzellen und bewegen sich amöboid in das benachbarte mütterliche Gewebe. Dabei bleiben sie häufig mit mehr oder weniger ausgedehnten Cytoplasmafortsätzen auf einer gemeinsamen Grundlage haften: der Reichert'schen Membran (Abb. 5,6). Diese Membran liegt am embryonalen Pol dem Entoderm außen locker auf und verliert sich in der Basis des Ektoplazentarkonus. Der schmale Raum zwischen der Reichert'schen Membran und dem Entoderm ist die Dottersackhöhle, die bei der Keimblattumkehr aus der Blastocystenhöhle entstanden ist (Abb. 5,6).
Bildungsorgan der kollagenen Membran sind die Trophoblast-Riesenzellen (Wimsatt, 1949).

C. ZEITRAUM NACH DER IMPLANTATION BIS ZUR BILDUNG DER DEFINITIVEN KEIMESHÖHLEN (5dpo-6dpo)

1. Vollzogene Implantation; Decidualhöhle

5 dpo ist - morphologisch - der Implantationsvorgang abgeschlossen. Die ehemalige Implantationskrypte ist frei von Uterusepithel und dessen Basalmembran, die Verbindung zum Uteruslumen bindegewebig verschlossen: Die Decidua capsularis umgibt den Keim von allen Seiten (Decidualhöhle), (Abb. 8). Die Decidua capsularis erhält während der Implantation eine charakteristische Gliederung (Abb. 7): In der äußeren von drei zu unterscheidenden Schichten liegen große, aufgelockerte Zellen in losem Verband; häufig sind sie 2-kernig. Unscharf davon grenzt sich ab eine Schicht flacher, konzentrisch um die Decidualhöhle angeordneter Zellen, die dicht aneinander liegen. Hieran schließt sich - oft ohne deutlichen Übergang - die innere Schicht gedrängter Zellen, die die begrenzende Wand der Decidualhöhle darstellt. In ihrem Aussehen unterscheiden sich diese Zellen stellenweise erheblich: Zum Teil sind es flache, langgestreckte Zellen mit länglichen Kernen; daneben findet man aufgetriebene mit runden Kernen; die Zellgrenzen sind nur schwer zu erkennen. Eine dritte Form von Zellen trägt deutlich das Aussehen degenerierender Zellen: Sie sind zusammengelagert zu ungeordneten Strängen, in denen keine Zellgrenzen auszumachen sind; ihre Genese ist unklar - durch amitotische Teilungen oder degenerative Syncytien entstanden (Abb. 16, 17,18).

Durch Gewebsschrumpfungen bei der Fixierung und Dehydrierung der Präparate wird diese innere Deciduaschicht häufig von der mittleren Schicht losgelöst (Abb. 7,8,17).

2. Die primitiven Keimeshöhlen (5dpo-6 1/2dpo)

Oben wurde bereits erwähnt, daß es bei der histologischen Präparation zu morphologischen Veränderungen im Objekt kommt. Besonders werden davon Hohlräume betroffen, die im Inneren von Objekten liegen. Sie werden durch Schrumpfung der Gewebe bei der Fixierung, Dehydrierung und beim Strecken artifiziell vergrößert und verzogen (Abb. 9,10). So stellen sich zum Beispiel (in vivo) kapillare Räume nach der präparativen Behandlung als relativ weite Spalten dar. Die Abschätzung der In-Vivo-Größe eines Raumes wird dadurch sehr unsicher.

4 1/2 dpo-5 dpo erscheint im Ektoderm eine schmale Lichtung, die sich mit der Streckung des Keimes zu einem länglich-ovalen Raum, der Amnioektoplazentarhöhle ausweitet (Abb. 8,11). Diese Amnioektoplazentarhöhle wird wenige Stunden nach ihrer Entstehung, etwa 5 dpo, durch einen ringförmigen ektodermalen Zellvorsprung, die primitive Amnionfalte, unvollständig geteilt

- in die primitive Amnionhöhle
- und die primitive Ektoplazentarhöhle (Abb. 8,11).

Die primitive Amnionhöhle ist als Grenze zwischen dem embryonalen und dem extraembryonalen Ektoderm anzusehen. In der HE-Färbung stellen sich die ventral (bezogen auf die Embryogenese) zur primitiven Amnionfalte gelegenen embryonalen Ektodermzellen als stark eosinophile Zellen mit chromatinreichen Kernen dar, das dorsale extraembryonale Ektoderm dagegen als heller gefärbte Zellschicht (Abb. 8,11).
Dem Ektoderm liegt außen das einschichtige proximale Entoderm auf. Die Zellen des Entoderms sind im Bereich des embryonalen Ektoderms kubisch bis flach, über dem extraembryonalen Ektoderm mehr kubisch bis hochprismatisch (Abb. 8,11). Dort, wo das proximale Entoderm an den Ektoplazentarkonus stößt, setzt es sich vom 7. Tag po an als distales Entoderm auf die Reichert'sche Membran fort (Abb. 11,12).
Die Reichert'sche Membran erscheint, wie oben dargestellt, zu Beginn der Implantation als gemeinsame Grundlage der lateralen und ventralen Trophoblastzellen, die zu Riesenzellen ausdifferenzieren (Abb. 5,6). Nach innen, zum Zentrum des Keimes hin, trennt sie ein schmaler Spaltraum, die Dottersackhöhle, vom Entoderm. Zwischen 5 1/2 dpo und 6 1/2 dpo wächst das distale Entoderm als Fortsetzung des proximalen an der inneren Fläche der Reichert'schen Membran in diesen Spalt hinein; etwa 6 1/2 dpo ist die Dottersackhöhle vollständig mit Entoderm ausgekleidet (Abb. 13). Zur Einschätzung der entwicklungsphysiologischen Funktionen der Dottersackhöhle (z.B. als Reservoir) ist die Kenntnis des relativen Volumens dieser Höhle von Interesse. Auf den Abbildungen

erscheint sie als recht voluminöser Raum, gemessen an dem Abstand zwischen der visceralen Wand (proximales Entoderm und Ektoderm) und der parietalen Wand (Reichert'sche Membran und distales Entoderm) (Abb. 15). Ihre In-Vivo-Größe muß jedoch geringer sein (s. Vorbemerkung zu III,2). Bei näherer Betrachtung der Abbildungen muß man zu dem Schluß kommen, daß sie als maximal kapillare Höhle anzusehen ist (Abb. 13): Das distale Entoderm findet man nur streckenweise an der Reichert'schen Membran fixiert; dort, wo die Membran frei ist von entodermalem Zellbelag, haften die distalen Entodermzellen an den proximalen. Das distale Entoderm muß also in vivo sowohl an der Reichert'schen Membran als auch am proximalen Entoderm fixiert sein und erst bei den Schrumpfungsvorgängen, je nach der Intensität des Haftens, zur einen bzw. zur anderen Seite gezogen worden sein.

3. Ektoplazentarkonus

Der Ektoplazentarkonus hat dorsal seine Lage zum Entoderm und Ektoderm beibehalten: Kappenförmig sitzt er mit der großflächigen Basis den dorsalen Entoderm- und Ektodermanteilen auf, über einen ektodermalen "Haftstiel" mit dem extraembryonalen Ektoderm verbunden (Abb. 11,12). Zur abembryonalen Spitze des Ektoplazentarkonus hin lockert sich der Verband der Ektoplazentarzellen auf; die Form der hellen Zellen wird sternförmig, über Zellfortsätze sind sie untereinander ver-

bunden. Sie proliferieren vorwiegend in Richtung des embryonalen Pols in den Bereich zwischen Reichert'scher Membran und innerer Schicht der Decidua capsularis (Abb. 11,12,14). Dort differenzieren sie sich zu den verschiedenen Formen der Trophoblastzellen: Der Reichert'schen Membran liegen fibrocytenähnliche Zellen an, deren Funktion es ist, die Membran zu bilden (Wimsatt, 1949) (Abb. 15). Zur Decidua capsularis hin werden die Trophoblastzellen voluminöser und polymorph; ihre Kerne erreichen Durchmesser von 50 bis 60 µ (Ward, 1954), selten sind sie 2-kernig (Abb. 16). Ihr Cytoplasma dehnt sich mit zahlreichen Fortsätzen, die mit benachbarten Zellen in Kontakt treten, über einen weiten Raum aus. In ihrer Gesamtheit bilden diese Zellen ein räumliches Netz, das sich zwischen der Reichert'schen Membran und der inneren Deciduaschicht um den ganzen Keim erstreckt (Abb. 7,18). Eine Funktion der Trophoblastzellen ist die ständige Ausweitung der Deciduahöhle, die durch das Wachstum des Keimes notwendig wird. Besonders die zu Riesenzellen hypertrophierten Zellen dringen einzeln (Abb. 17) oder in breiter Front (Abb. 18) in die Decidua ein und vergrößern die Höhle. Stellenweise findet man sie tief in der Decidua (Abb. 19). Bei der Invasion der Trophoblastzellen in das mütterliche Gewebe eröffnen sie zahlreiche mütterliche Blutgefäße, aus denen sich das Blut in die Zwischenräume des Zellnetzes um den Keim ergießt und ihn auf diese Weise an den Blutkreislauf des mütterlichen Organismus "anschließt".

D. BILDUNG DER DEFINITIVEN KEIMESHÖHLEN (6dpo-7dpo)

Etwa 6 dpo erscheinen im Bereich der primitiven Amnionfalte erste Mesodermzellen, die entlang der Falte zwischen Entoderm und Ektoderm einen ringförmigen Zellwulst bilden, der sich in die Amnioektoplazentarhöhle vorwölbt und die schmale primitive Amnionfalte verstreichen läßt. Von diesem mesodermalen Ring aus schiebt sich in embryonaler und abembryonaler Richtung mehrschichtiges Mesoderm als drittes Keimblatt zwischen Entoderm und Ektoderm (Abb. 20).

Wenige Stunden später, etwa 6 1/2 dpo, erscheinen im ringförmigen Mesoderm Lichtungen, die sich rasch ausweiten und zum primitiven Exocoel konfluieren (Abb. 20,21). Das primitive Exocoel ist vollständig ausgekleidet mit einschichtigem Mesoderm, das nach innen (zur Amnioektoplazentarhöhle hin) abembryonal und embryonal von Ektoderm bedeckt ist. Die abembryonale Wand des primitiven Exocoels bezeichnen Foote et al., 1954 als vordere, die embryonale Wand als hintere Amnionfalte. Außen (zum Dottersack hin) liegt dem einschichtigen Mesoderm proximales Entoderm auf (Abb. 20,21).

Im Laufe der nächsten Stunden, etwa 6 3/4 dpo, vergrößert sich das Volumen des primitiven Exocoels rapide: Die innere Wand wölbt sich tief in das Lumen der Amnioektoplazentarhöhle und teilt diese vorerst

unvollständig in die abembryonal gelegene Ektoplazentarhöhle und die embryonal gelegene Amnionhöhle (Abb. 21). Wenig später trifft die innere Wand im Zentrum der ehemaligen Amnioektoplazentarhöhle zusammen und verwächst. Nach der Verödung der mittleren Anteile der Verwachsungsstelle ist ein einheitliches, definitives Exocoel entstanden, das abembryonal durch das Chorion, embryonal durch das Amnion begrenzt wird; Chorion bzw. Amnion sind aus der vorderen bzw. hinteren Amnionfalte entstanden (Abb. 22).

Etwa 6 3/4 dpo, mit der Ausbildung des definitiven Exocoels, ist die Grundgestalt aller embryonalen Höhlen festgelegt: die embryonale Amnionhöhle, das mittelständige Exocoel und die abembryonale Ektoplazentarhöhle (Abb. 22). Die Amnionhöhle ist von embryonalem, die Ektoplazentarhöhle von extraembryonalem Ektoderm ausgekleidet; zwischen Entoderm und Ektoderm proliferiert in embryonaler und abembryonaler Richtung das Mesoderm, das das Exocoel einschichtig begrenzt. Zur Dottersackhöhle hin wird das Mesoderm vom proximalen Entoderm bedeckt, das sich am Ektoplazentarkonus auf die Reichert'sche Membran fortsetzt. Distales und proximales Entoderm liegen so dicht aneinander, daß dazwischen nur eine kapilläre Dottersackhöhle bestehen kann.
Zwischen der Reichert'schen Membran und der inneren Schicht der Decidua capsularis erstreckt sich ein netzartiges Trophoblastzellgewebe, das vom Ektoplazentarkonus in diesen Raum einwächst, und in dessen Zwischenräumen mütterliches Blut zirkuliert (Abb. 22).

E. KURZE DARSTELLUNG DER ORGANOGENESE (7dpo-8 1/4dpo)

Die Organogenese spielt für die entwicklungsphysiologischen Untersuchungen (Teil II) nur eine geringe Rolle. Deshalb sollen hier die Vorgänge im Zeitraum von 7 dpo-8 1/4 dpo nur stichpunktartig in Anlehnung an Graves (1945) dargestellt werden.

1. Praesomiten-Stadium

Zu Beginn des 8. Tages (dpo) beginnen sich Primitivstreifen, Chorda, Neuralrinne und -platte zu bilden. Wenige Stunden später entsteht am kranialen Keimesende die paarige Herzanlage und am kaudalen die mesometrale Allantois (Abb. 23). Im Mesoderm der visceralen Dottersackwand sind erste Angioblasten zu erkennen; die parietale Wand wird nicht vaskularisiert, da hier das Mesoderm fehlt.

2. Somiten-Stadium

Erste Somiten entstehen etwa 7 1/4 dpo am kranialen Keimesende; zu dieser Zeit ist die Neuralrinne in ihrer ganzen Länge noch offen (Abb. 24). Mit dem Beginn der Kopffaltung (etwa 7 1/2 dpo) stülpt sich der Kopfdarm ein; die Bildung des Schwanzdarmes hat schon kurze Zeit vorher begonnen. Die Herzanlage vergrößert sich rasch, bleibt aber noch paarig. Am kaudalen Ende des Keimes wächst die Allantois durch die Amnionhöhle und das

Exocoel in Richtung Ektoplazentarkonus, an dessen Basis die Plazentabildung begonnen hat (Abb. 25).

Während dieser Vorgänge erfährt das Exocoel eine beträchtliche Volumenerweiterung; dabei wird das Chorion nach abembryonal abgedrängt (Abb. 24). Es verwächst zentral mit der Basis des Ektoplazentarkonus; die Ektoplazentarhöhle wird dadurch zu einem seitlich von der Verwachsungsstelle gelegenen, ringförmigen Raum reduziert (Abb. 25).
Gegen Ende des 8. Tages po sind etwa 10 Somiten zu zählen. Von kranial her schließt sich die Neuralrinne zum Neuralrohr, läßt jedoch den kranialen und kaudalen Neuroporus offen. Die paarigen Herztuben verschmelzen etwa 8 dpo (Abb. 26).

In dieser Zeit streckt sich der gesamte Keim und geht aus einer ventral-konvexen Längskrümmung in eine dorsalkonvexe über. Gleichzeitig erfolgt eine Drehung der Längsachse in Bezug zur Uteruslängsachse; wurden die Feten bei Uterusquerschnitten bis etwa 8 dpo quer geschnitten (senkrecht zur Längsachse des Keimes), so trifft man sie nach 8 dpo längs. Wenige Stunden nach Vollendung des 8. Tages po erreicht die Allantois die Basis des Ektoplazentarkonus und breitet ihr Mesoderm über die gesamte Fläche der Basis aus (Abb. 25). Etwa gleichzeitig wächst die viscerale Dottersackwand an den Randbezirken des Ektoplazentarkonus zottig aus; in die Zotten sprossen Kapillaren ein.

Mit der einsetzenden allantoiden Plazentation und der Vollendung der vitellinen Plazenta werden die physiologischen Voraussetzungen geschaffen, die für die weitere Organogenese und vor allem für das Größenwachstum des Hamsterkeimes erforderlich sind.

Teil II: ENTWICKLUNGSPHYSIOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN

A. SPEZIELLE METHODEN UND ERGEBNISSE

Entsprechend der Fragestellung: "Proteinübertritt von der Mutter zum Embryo" muß das Fluorescenzserum dem mütterlichen Tier appliziert werden. Dabei ist es jedoch notwendig, die sich während der Embryogenese wandelnden Stoffwechselbeziehungen in Betracht zu ziehen und die Art und Weise der Applikation daran anzupassen:

1. Versuchsgruppe A

Zwischen 3 dpo und 4 dpo erfolgt der Stoffaustausch zwischen Mutter und Embryo über das Uterussekret. Es bietet sich folglich an, das Fluorescenzserum in das Lumen der trächtigen Uteri zu injizieren.

2. Versuchsgruppe B

Während der Phase der Implantation (4-4 1/2 dpo) besteht eine Stoffwechselbeziehung sowohl über das Uterussekret wie auch über das mütterliche Blut. Hier ist die intrauterine mit der intravenösen Injektion zu verbinden.

3. Versuchsgruppe C

Am Ende der Implantationsphase liegt der Keim in der Deciduahöhle, allseitig von Decidua umgeben. Das Fluorescenzserum ist ausschließlich intravenös zu applizieren.

4. Kontrollen

VERSUCHSGRUPPE A (3,3 1/2dpo und 4dpo)

Am Ende des 2. Schwangerschaftstages (ca. 3 dpo) treten die Keime vom Eileiter- in das Uteruslumen über und liegen bis etwa 4 dpo frei im Uteruslumen bzw. in dessen antimesometralen Krypten (siehe Teil I). In diesem Zeitraum ist das Uterussekret als das Medium anzusehen, das den Stoffaustausch zwischen Mutter und Embryo vermittelt. Mit einer Injektion des Serums in das Uteruslumen lassen sich die Blastocysten in einem meßbaren Zeitabschnitt mit markiertem Eiweiß von ausreichender Konzentration umgeben: Je zwei Hamsterweibchen im Schwangerschaftsalter von 3, 3 1/2, 4 dpo wurden nach einer Äther-Vornarkose mit Thiogenal betäubt und laparatomiert. In die Lumina der freigelegten Uterushörner, die am vaginalen Ende antimesometral eröffnet worden waren (um die Hauptgefäße zu schonen), erfolgte über einen dünnen, weichen Polyäthylen-Schlauch die vorsichtige Injektion von ca. 0.03 ml Fluorescenzserum (37° C). Nach der Entfernung des Schlauches verschloß eine feine Klemme das eröffnete Lumen so, daß sie die Gefäße nicht miterfaßte. Etwa 25 min nach der Injektion wurden die Uterushörner in toto extirpiert; das Hamsterweibchen kam durch eine Überdosis Thiogenal ad exitum.

Vom tubären Ende her erfolgte nun die Ausspülung der Blastocysten mit Hank'scher Lösung (37° C). Dazu wird ein mit einer Rekordspritze verbundener Polyäthylen-

schlauch wenige mm in das Uteruslumen vorgeschoben. Am vaginalen Ende bleibt das Lumen noch verschlossen, so daß es bei der Injektion der Spülflüssigkeit im Lumen zu einem leichten Oberdruck kommt, der die Uteruskrypten eröffnet. Durch vorsichtiges Beklopfen gerät die Flüssigkeit im Lumen in Bewegung und spült einen Teil der Blastocysten aus den Uteruskrypten. Nach dem Öffnen der Klemme am vaginalen Uterusende fließt die Flüssigkeit in das bereitgestellte Schälchen.

Die unter dem Mikroskop in der Spülflüssigkeit gefundenen Blastocysten wurden mit einer fein ausgezogenen Glaspipette auf hohlgeschliffene Objektträger übertragen und

1. durch den mehrfachen Austausch der Hank'schen Lösung vom anhaftenden Eiweiß des Fluorescenzserums befreit,
2. in einer Methanolreihe fixiert (20, 40, 60, 80, 100, 100 %),
3. nach der Abdeckung des Hohlschliffes mit einem Deckglas im Normallicht und anschließend im UV-Licht photographiert.

ERGEBNISSE (Abb. 28)

Die Membrana pellucida stellt keine Barriere für Proteine dar. Fluorescierende Eiweiße sind in den perivitellinen Raum eingedrungen.

Die Zellen der Blastocysten sind jedoch frei von spezi-

fischer Fluorescenz; im Zeitraum von 3-4 dpo wird also von den Zellen des Keimes kein Eiweiß aufgenommen. Auch über die Interzellularspalten dringt kein Eiweiß in das Innere der Blastocysten.

VERSUCHSGRUPPE B (4 1/4dpo und 4 3/4dpo)

Während der Implantationsphase nimmt die Blastocyste über Trophoblastzellen direkten Kontakt mit der Decidua auf, bleibt aber auch mit dem Uteruslumen verbunden. Aus diesen beiden verschiedenen Stoffwechselmöglichkeiten ergibt sich die Forderung an das methodische Verfahren, sowohl im mütterlichen Gewebe wie auch im Uterussekret ausreichende Konzentration an markierten Proteinen zu schaffen.

1. Intravenöse Injektion des Fluorescenzserums

Die i.v.-Injektion bereitet beim Goldhamster einige Schwierigkeiten. Hautvenen von genügendem Kaliber sind nicht vorhanden, die Injektion in die Sublingualvenen ist diffizil und läßt sich wegen der engen räumlichen Verhältnisse nur ungenügend kontrollieren. Als einzige befriedigende Möglichkeit bleibt die Injektion in eine freigelegte tieferliegende Vene mit ausreichender Beobachtungslänge. Gewählt wurde die Vena femoralis, deren Freilegung einen relativ leichten Eingriff darstellt.

Das Trigonum femoralis wird entlang des Sulcus femoralis durch einen Hauptschnitt von ca. 1 cm Länge eröffnet. Nach dem stumpfen Auseinanderdrängen des Fettgewebes erscheint in der Tiefe das Gefäßbündel. Vor der Injektion muß die derbe Fascie des Gefäßstranges gespalten werden, um die dünne Nadel sicher in die verschiebliche Vene einführen zu können.

Die Injektionsmengen an Fluorescenzserum betrugen 0,1 ml/10 g Körpergewicht. Diese Menge bietet optimale Fluorescenzintensität bei noch vertretbarer Belastung der kardiovaskulären Regulationsfähigkeit (Dixon und Maurer, 1955). Um jedoch der Gefahr des Schocks vorzubeugen, wurde die Injektion auf mehrere Minuten ausgedehnt, und außerdem erfolgte vorher eine Aspiration von etwa 0.5 ml Blut.

2. Intrauterine Injektion

Ca. 25 min nach der intravenösen Injektion wurde das Hamsterweibchen laparotomiert und das Fluorescenzserum in der gleichen Weise intrauterin appliziert wie bei den Tieren der Versuchsgruppe A. Das Ausspülen der Blastocysten in der Phase der Implantation ist jedoch nicht mehr möglich; so wurden etwa 25 min (ca. 50 min nach der i.v.-Injektion) nach der i.u.-Injektion wie bei den Tieren der Versuchsgruppe A die Uterushörner extirpiert. Vom tubären Ende her erfolgte eine vorsichtige Spülung der Lumina, mit dem Ziel,

das freie Fluorescenzserum im Uteruslumen zu eliminieren. Die Uterushörner wurden anschließend in Teilstücke von 5-10 mm Länge geschnitten und der histologischen Präparation zugeführt.

Alle Tiere blieben während des Versuches am Leben; nach der Extirpation des Uterus kamen sie durch eine Überdosis Thiogenal ad exitum.

ERGEBNISSE (4 1/4-4 3/4dpo), (Abb. 29,30)

1. Zwischen 4 1/4 und 4 3/4 dpo nehmen Entoderm und Ektoderm kein Eiweiß auf; das Cytoplasma dieser Zellen ist frei von Fluorescenz.

2. Im Cytoplasma einiger Trophoblastzellen wird Eiweiß in großen Vakuolen gespeichert. Bei diesen Zellen handelt es sich um Trophoblast-Riesenzellen. Die nicht ausgereiften Trophoblastzellen nehmen kein Eiweiß auf.

Bei methodischen Vorversuchen, bei denen das Fluorescenzserum ausschließlich intrauterin appliziert wurde, ergaben sich Nebenbefunde, die die Funktionen des Uterusepithels deutlich machen:

Nur zwischen 4 1/4 und 4 3/4 dpo zeigt das Uterusepithel folgendes Bild (Abb. 31,32).

1. Zwischen den Implantationsstellen resorbieren nur einzelne Zylinderzellen; solche Zellen sind diffus über das Lumen verteilt (Abb. 31).

2. Im Bereich der Implantation resorbieren alle Zellen des mesometralen Epithels das markierte Eiweiß (Abb. 32).

3. Das Uterusepithel in der direkten Nachbarschaft der sich implantierenden Blastocyste nimmt kein Eiweiß auf, ist also frei von Fluorescenz (Abb. 32).

In Übereinstimmung mit den oben dargestellten Ergebnissen zeigt die Blastocyste selber keine Fluorescenz.

VERSUCHSGRUPPE C (5; 5 1/2; 6; 6 1/2; 6 3/4; 7; 7 1/4; 7 1/2; 7 3/4 und 8dpo)

Mit der Vollendung der Implantation (ca. 5 dpo) wird der Keim allseitig von Decidua umgeben; die Verbindung zum Uteruslumen ist bindegewebig verschlossen.

Die Stoffwechselverbindung muß über das in die Deciduahöhle einströmende, mütterliche Blut erfolgen. Deshalb wurde bei der Versuchsgruppe C das Fluorescenzserum ausschließlich intravenös gegeben, und zwar in derselben Weise wie bei den Tieren der Versuchsgruppe B (s. dort).

ERGEBNISSE (5-6dpo), (Abb. 33)

Die Befunde unterscheiden sich nicht von denen der Versuchsgruppe B (4 1/4-4 3/4 dpo). Entoderm und Ekto-

derm fluorescieren nicht. Die einzigen Strukturen, die Eiweiß aufnehmen, sind auch hier Trophoblast-riesenzellen, die in der Regel nahe der Reichert'schen Membran liegen (Abb. 3). Die Reichert'sche Membran selbst stellt sich als Barriere für Eiweiß dar: Die "Dottersackhöhle", die die Reichert'sche Membran umschließt, ist frei von Fluorescenz.

6 - 6 1/2 dpo (Abb. 34,35)

Gegen 6 1/2 dpo hin verliert die Reichert'sche Membran ihre Eigenschaft als starre Protein-Schranke. Ihre Durchlässigkeit für Eiweiß manifestiert sich in der Fluorescenz des Cytoplasmas einiger parietaler Dottersackzellen (Abb. 34,35). Die "Dottersackhöhle" selber, das viscerale Entoderm und das Ektoderm sind jedoch frei von fluorescierendem Eiweiß. Auch das Verhalten der Trophoblast-Riesenzellen weicht von den bisherigen Befunden nicht ab; die Riesenzellen in der Nähe der Reichert'schen Membran haben Eiweiß in großen Vakuolen gespeichert.

6 1/2 - 7 dpo (Abb. 36,37)

Zwischen 6 1/2 und 7 dpo dringt Eiweiß in die "Dottersackhöhle" ein; fluorescierende Proteinkomplexe füllen den Raum zwischen parietalem und visceralem Entoderm. Parietale Entodermzellen haben Eiweiß in ihr Cytoplasma aufgenommen, während jedoch den visceralen die Proteinkomplexe nur angelagert sind (Abb. 36,37).

Im übrigen unterscheiden sich die Befunde nicht von denen der Stadien 6 - 6 1/2 dpo: Ektoderm fluoresciert nicht, die Riesenzellen nehmen Eiweiß auf.

7 - 8 dpo (Abb. 38,39)

Im Laufe des 8. Tages beginnt die intrazelluläre Resorption des markierten Eiweißes durch das viscerale Entoderm, wobei die Aufnahme im Bereich des zukünftigen Urdarmes (proximales Entoderm) intensiver ist und sich zeitlich etwas früher nachweisen läßt als im distalen Bereich des visceralen Entoderms. Eine transzelluläre Passage des Eiweißes durch die Zellen des visceralen Entoderms erfolgt jedoch nicht.

B. KONTROLLEN

1. Injektion nicht markierter Serum-Proteine

Ziel dieser Kontrolle ist es, nachzuprüfen, ob durch die Injektion heterologen Serums und durch das präparative Verfahren fluorescierende Strukturen induziert werden.

Ein Hamsterweibchen im Schwangerschaftsalter von 6 3/4 dpo wurde entsprechend der Versuchsgruppe C behandelt. Anstelle des Fluorescenzserums wurde jedoch nicht-FITC-markiertes Rinderserum in die Vena femoralis injiziert.

Ergebnisse:

Die Präparate zeigten ausschließlich die schwache Eigenfluorescenz des Gewebes; keine "Brillant"-Fluorescenz der Wellenlänge 550 nm.

2. Verlängerung der Versuchsdauer auf 2 h nach Injektion des FITC-markierten Serums

Diese Kontrolle weist nach,

a) ob es durch den längeren Verbleib des markierten Protein im lebenden Organismus zur Dissoziation der Farbstoff-Eiweiß-Verbindung kommt, und

b) ob die Verdoppelung der Versuchszeit die Ergebnisse grundlegend verändert, d.h. ob weitere embryonale Gewebsarten das Fluorescenzserum aufnehmen oder es zur intensiveren und zeitlich früheren Resorption kommt.

Aus diesem Grund wurde für diesen Kontrollversuch das Schwangerschaftsalter 7 dpo gewählt, bei dem nach einstündiger Wirkzeit des Fluorescenzserums Eiweiß zwar vom parietalen Entoderm intrazellulär aufgenommen wird, ein Einstrom in die "Dottersackhöhle" aber erst in den nächsten Entwicklungsstunden erfolgen wird.

Ein Hamsterweibchen im Schwangerschaftsalter von 7 dpo wurde wie die Tiere der Versuchsgruppe C behandelt. Lediglich die Wirkdauer des Fluorescenzserums wurde auf 2 h verdoppelt.

Ergebnisse:

Die Verlängerung der Versuchsdauer auf 2 h zeigt keine von den einstündigen Versuchen unterschiedlichen Ergebnisse.

IV. DISKUSSION

1. Zur Methode

a) Allgemein:

Die in-vivo-Applikation von Fluorescenzseren ist in erster Linie von Mayersbach (1957, 1958) und Schiller et al. (1953) eingehend untersucht und erprobt worden. Mayersbach zeigt 1957, daß Eiweiß durch die Markierung mit Fluorescenzfarbstoffen biologisch nicht oder nur geringfügig verändert wird, und 1958, daß nach der i.-v.-Injektion der Fluorescenzeiweiße in ein schwangeres Tier diese unverändert im Feten erscheinen.

Schiller et al. (1953) untersuchten eingehend das in-vivo-Verhalten von i.-v.-gegebenem homologen und heterologen Fluorescenzserum sowie C^{14}-markiertem Eiweiß. Sie prüften Serumkonzentrationskurven, Halbwertszeiten, Kreislaufverhalten, besonders in Kapillaren und die Speicherung der Eiweiße in der Leber und konnten nachweisen, daß homologes, heterologes und C^{14}-markiertes Eiweiß sich bei erstmaliger Injektion biologisch identisch verhalten. Die Fluorescenzfarbstoffe bleiben solange an das Eiweiß gekoppelt, bis das Eiweißmolekül selbst abgebaut wird.

b) Freier Farbstoff:

Um bei der Koppelung von Fluorescenzfarbstoff an Proteine maximale Absättigung zu erreichen, muß FITC im Überschuß gegeben werden. Als optimales Verfahren zur Elimination des unspezifischen Färbevermögens wird von Chadwick et al. (1960) die Dialyse gegen physiologische Kochsalzlösung und anschließendes Schütteln in Aktiv-Kohlepulver angegeben.

Auch im Organismus entsteht durch den Abbau der markierten Eiweiße freier Farbstoff (Schiller et al., 1953), dessen Konzentration von der Halbwertszeit der Eiweiße und somit von der Versuchsdauer abhängt. Die durchschnittliche Halbwertszeit der Serumproteine wird von Schiller et al., 1953 mit 5,3 Tagen berechnet. Homologe und heterologe Proteine haben nahezu identische Zeiten.

Wichtig ist jedoch, daß es in den ersten 20 h zu wesentlich höherem Serumkonzentrationsabfall als in den noch folgenden Stunden kommt, der zurückzuführen ist einmal auf Speicherung in der Leber und zum anderen auf einen verstärkten Abbau des durch die Seruminjektion entstandenen Eiweißüberschusses im Kreislauf. Bei einer Versuchsdauer von 1 h (bis max. 2 h) ist der Anfall an freiem FITC jedoch äußerst gering. In keinem der ausgewerteten mikroskopischen Präparate konnte eine erhöhte diffuse Gewebsfluorescenz gefunden werden.

Die Versuchsdauer von 1 h liegt zudem in dem von Anderson (1955) für diese Fragestellung angegebenen Zeitraum (1/2 - 2 h).

c) Intravenöse Injektion:

Die für die Untersuchung notwendige Injektion einer relativ großen Menge Serum (10 ml/100 g Körpergewicht) direkt in den Kreislauf birgt die Gefahr eines Kreislaufschocks in sich, der bei einer Versuchsdauer von 1 h und bei erstmaliger Injektion dieses Serumtypes nur auf das Quantum der injizierten Flüssigkeit zurückzuführen wäre. Ein solcher Schock hätte zumindest die Mangelversorgung auch des Uterus zur Folge und würde damit die Ergebnisse der Untersuchung verfälschen.

Zur Verhütung eines Schocks wurden in Anlehnung an Mayersbach (1958) vor der Injektion langsam etwa 0,5 ml

Blut aus der Vena femoralis aspiriert und die Injektion anschließend über mehrere Minuten ausgedehnt.

Die Kontrolle, ob die Injektion einen Schock verursacht hat oder nicht, bereitet beim narkotisierten Hamster erhebliche Schwierigkeiten: Es kann jedoch aus etwaigen Farbveränderungen der Mundschleimhaut auf die periphere Kreislaufsituation geschlossen werden. Zum zweiten lassen sich durch das Auflegen eines Fingers auf die linke Brustwand die Herzaktionen ausreichend einschätzen.
Bei keinem der Versuchstiere konnten jedoch Anzeichen eines Kreislaufschocks gefunden werden, und keines der verwendeten Tiere starb während des Versuches.

d) Die intrauterine Injektion:

Während der Nidationsphase erreicht das Uterussekret Proteinkonzentrationswerte, die denen des Serums entsprechen oder diese sogar übersteigen (Zimmermann et al., 1963 und Schwick, 1965 beim Kaninchen). Die quantitative und qualitative Verteilung der einzelnen Proteinfraktionen im Uterussekret unterscheidet sich jedoch erheblich von denen des mütterlichen Blutes (z.B. Uterusglobin, Schwick, 1965). Bei der intravenösen Injektion des FITC-markierten Eiweißes wird es keinesfalls zu einer representativen Verteilung des markierten Eiweißes auf die einzelnen Proteinfraktionen im Uterussekret kommen: Das tierspezifische Eiweißspektrum

ist also zu einem großen Teil Resultat der Syntheseleistung teils des Uterusepithels. Die Ergebnisse der Versuchsgruppen A und B sind folglich nur von der Tatsache her zu beurteilen, daß das Prüfmedium, das FITC-markierte Eiweiß, nicht das physiologische Proteinspektrum des Uterussekrets repräsentiert.

Das intravenös gegebene Fluorescenzserum wird immer teilweise in das Uteruslumen sezerniert. Dieser Vorgang läßt sich jedoch in seinem zeitlichen Ablauf und seiner Quantität nicht kontrollieren. Es schien uns von daher gesehen angebracht, eine direkte intrauterine Applikation vorzunehmen.

e) Verwendung von heterologem Serum:

Zimmermann (1965) zeigt, daß beim Kaninchen während der "offenen Phase" die Protein-Resorption ohne Selektion erfolgt. Auch bei der Ratte können Krzysowska-Gruca und Schiebler (1967) in einem späteren Entwicklungsstadium keine Selektion durch das Dottersackepithel nachweisen. Diese Aussage erscheint bei Hemmings (1956, Kaninchen) und Smith und Schlechtman (1962, Kaninchen) in abgeschwächter Form: Bei älteren Feten kommen sie zu dem Ergebnis, daß es bei der Eiweißaufnahme zu graduellen Konzentrationsunterschieden zwischen einzelnen Proteinfraktionen und zudem zwischen Eiweißen verschiedener Herkunft kommt.

Da diese Fragen auch für die Verhältnisse beim Hamster unbeantwortet bleiben und die Fragestellung dieser Arbeit von der Aufnahme ohne Selektion ausgeht, wählten wir das leichter zu gewinnende Rinderserum und führten es als methodisches Parameter ein. Die dargestellten Ergebnisse sind folglich nur unter dem Gesichtspunkt zu sehen, daß heterologes Eiweiß verwendet wurde.

2. Diskussion der Ergebnisse

Im Verlauf morphologischer Untersuchungen konnte gezeigt werden, daß beim Goldhamster in keiner Phase der hier beobachteten Embryogenese eine voluminöse Dottersackhöhle angelegt wird. Die Dottersackhöhle ist beim Goldhamster nur als Relikt vorhanden, als ein kapillärer Spalt. Während der gesamten beobachteten Embryogenese bleibt dieser schmale Raum durch die Reichert'sche Membran und, von ca. 6 1/2 dpo an, auch durch das distale Entoderm von den Trophoblast-Riesenzellen getrennt. Beim Kaninchen hingegen stellt die Dottersackhöhle einen voluminösen Raum dar, dessen abembryonale Wand von Trophoblastzellen gebildet wird, der die Reichert'sche Membran und die Entodermschicht fehlen.
Von diesen morphologischen Differenzen her gesehen, ist eine direkte Analogie zwischen den Verhältnissen beim Goldhamster und denen beim Kaninchen nicht zu ziehen. Dennoch werden folgende wesentliche Übereinstimmungen deutlich:

1. Die ausdifferenzierten Zellen des Trophoblasten stellen das embryonale Gewebe dar, daß mit Beginn der Implantationsphase die Fähigkeit zur Pinocytose erwirbt (Zimmermann, 1965, Kaninchen; Anderson, 1955; Lambson, 1966, Ratte). Diese Fähigkeit zur intrazellulären Aufnahme beschränkt sich nicht nur auf Makroglobuline; auch kolloidale Teilchen wie Trypanblau können resorbiert werden (Krzyzowska-Gruca und Schiebler, 1967).

2. Erst mehrere Tage später reifen in den Zellen des Entoderms die zellulären Organe, die eine Resorption kolloidaler Teilchen ermöglichen (Anderson, 1955; Lambson, 1966; Padykula et al., 1966). Ein interzelluläres Eindringen der Proteine in die übrigen Gewebe wird von den luminalen Schlußleisten des Entoderms verhindert (Lambson, 1966).

Beim Goldhamster läßt sich ein Nacheinander der Reifungsprozesse zur Proteinresorption deutlich erkennen: Während und nach der Implantation nehmen nur d i e Trophoblastzellen Eiweiß auf, die zu Riesenzellen ausdifferenziert sind. Der Ektoplazentarkonus mit seinen jungen Trophoblastzellen bleibt frei von Fluorescenz.

Die übrigen embryonalen Gewebe kommen mit dem mütterlichen Blut nicht in Kontakt, solange sich die Reichert'sche Membran und die bis ca. 6 1/2 dpo ausgebildete parietale Entodermzellschicht als Eiweißbarriere dar-

stellten. Etwa 6 1/2 dpo beginnt sich diese Barriere zu lockern, die "Dottersackhöhle" bleibt jedoch solange frei von Eiweiß mütterlicher Herkunft, wie das parietale Entoderm Makromoleküle nur intrazellulär aufzunehmen vermag. Die Fähigkeit zur transzellulären Passage entwickelt sich erst später (Lambson, 1966). Zwischen 6 1/2 dpo und 7 dpo erscheint mütterliches Eiweiß im Lumen der "Dottersackhöhle", bleibt dem visceralen Entoderm jedoch vorerst nur aufgelagert. Wenige Stunden später beginnt die intrazelluläre Resorption der Proteine in die Zellen des visceralen Entoderms, wobei die Zellen des zukünftigen Urdarmes zeitlich und in ihrer Aufnahmeintensität dem übrigen visceralen Entoderm vorrangig sind.

Die intrazelluläre Eiweißresorption durch Trophoblast-Riesenzellen, die Durchlässigkeit der Reichert'schen Membran und die Eiweißaufnahme durch die Zellen des parietalen Entoderms bleiben während des untersuchten Zeitraumes bis zum Ende des 8. Tages weiter bestehen.

Die Ergebnisse zeigen ein zeitabhängiges Aufnahmeverhalten von heterologen Eiweißen in den Keim des Goldhamsters bis 8 Tage nach der Ovulation. Der Einstrom des FITC-markierten Serums beginnt mit der Aufnahme in die differenzierten Trophoblast-Riesenzellen. Dann lassen die Reichert'sche Membran und die peritalen Dottersackzellen die Serumeiweiße penetrieren und sie sind in der Dottersackhöhle nachweisbar. Schließlich nimmt auch

das viscerale Dottersackepithel die markierten Eiweiße auf. Insofern sind also die Verhaltensweisen beim Goldhamster mit denen beim Kaninchen vergleichbar. Es existiert auch hier eine "offene Phase" (Gottschewski und Zimmermann, 1961; Zimmermann, 1965, 1966), in der einige embryonale Gewebe mit applizierten heterolosen Eiweißen in Kontakt kommen bzw. sie aufnehmen. In Analogie dazu kann auch ein Einstrom mütterlicher Proteine postuliert werden. Da dieses Verhalten bei 2 Species nachweisbar ist, scheint es sich um ein allgemeingültiges Phaenomen bei Nagern zu handeln. Inwieweit es auf andere Tierordnungen übertragen werden kann, bleibt abzuwarten. In gewissen Einzelheiten bestehen aber zwischen Kaninchen und Goldhamster doch Unterschiede. Beim Kaninchen steht offenbar der Trophoblast im Mittelpunkt des Transportgeschehens, während beim Goldhamster auch der Weg über die Reichert'sche Membran und das parietale Dottersackepithel eingeschlagen wird. Diese Befunde sind auch im Zusammenhang mit teratologischen Experimenten interessant. Sie können die Deutung von Befunden nach Applikation von teratogenen Substanzen in diesen frühen Phasen erleichtern.

V. ZUSAMMENFASSUNG

Bei Goldhamstern (Cricetus aureatus Waterhouse) wird der Übertritt von Proteinen von der Mutter auf den Keim in der frühen Embryonalphase (Tag 3 bis 8 nach der Ovulation = dpo) untersucht. Dieser Übertritt wird morphologisch durch die Verwendung von fluorescenzmarkiertem Rindervollserum erfaßt.

Zum besseren Verständnis der Befunde und wegen des Fehlens systematischer Beschreibungen dieser Entwicklungsphasen wird der Arbeit eine genauere deskriptive Darstellung der Entwicklung des Tages 3 bis 8 nach der Ovulation bei dieser Species vorangestellt. Der zeitliche Ablauf der einzelnen Stadien und ihr strukturelles Verhalten entspricht weitgehend den Verhältnissen bei anderen Nagern. Nur die Dottersackhöhle stellt durch ihre geringe Größe eine Besonderheit dar. Am Tag 3 1/2 dpo löst sich die Zona pellucida auf, die Blastocysten ordnen sich regelmäßig im Uteruslumen an. Am Tag 4 1/2 dpo beginnt die Invasion des Trophoblasten. Der Implantationsvorgang ist am Tag 5 dpo abgeschlossen. In der Zeit zwischen Tag 5 und 6 1/2 dpo bilden sich die primitiven Keimeshöhlen aus, zwischen Tag 6 und 7 dpo die definitiven Keimeshöhlen. Ab Tag 8 dpo beginnt die Organogenese.

Zur Darstellung des Proteinübertrittes von der Mutter auf den frühen Keim werden 3 Applikationswege gewählt - entsprechend den zeitabhängigen physiologischen Verhältnissen: 1. Intraluminale Injektion (Tag 3 und 4 dpo), 2. in-

traluminal und intravenöse Injektion (Tag 4 bis 4 1/2 dpo) und 3. intraluminale Injektion (ab Tag 4 1/2 dpo).

An den Tagen 3 bis 4 (1. Applikationsform) penetrieren die markierten Serumproteine zwar durch die Zona pellucida, jedoch nehmen die Morula- bzw. Blastocystenzellen keine Proteine auf. An den Tagen 4 1/4 bis 4 3/4 dpo (2. Applikationsform), beginnen einzeln reife Trophoblastriesenzellen Proteine aufzunehmen. Interessant scheint ein Befund am Uterusepithel nach intraluminaler Injektion zu sein. An der Implantationsstelle nehmen alle Uterus-Epithelzellen Protein auf, in den benachbarten Bereichen dagegen ist eine Resorption nicht nachweisbar. An den Tagen 5 bis 6 dpo (3. Applikationsform) hat sich das Bild nicht geändert. Am Tag 6 dpo wird die REICHERT'sche Membran durchlässig und einzelne parietale Entodermzellen beginnen mit der Aufnahme. Zwischen den Tagen 6 1/2 und 7 dpo dringen die Proteine in die Dottersackhöhle ein. Am Tag 7 dpo schließlich beginnt die Resorption der markierten Proteine aus dem Rindervollserum, ohne daß jedoch der eigentliche Keim eine Aufnahme zeigt.

Die Ergebnisse zeigen also in Abhängigkeit von der Zeit einen zunehmenden Übertritt von Proteinen aus der Mutter bzw. Umgebung in den frühen Keim. Damit kann in gewisser Weise die Vorstellung von der Existenz einer "offenen" Phase (GOTTSCHEWSKI, ZIMMERMANN) auch beim Goldhamster bestätigt werden. Die Kenntnisse dieser Befunde erleichtern die Planung, Durchführung und Deutung teratologischer Experimente.

VI. LITERATUR

Adams, F.W. and Hillemann, H.H. (1950) Morphogenesis of the vitelline and allantoic placentae of the golden hamster (Cricetus auratus).
Anat. Rec. 108, 363-384.

Anderson, J.W. (1955) The placental barrier to gamma-globulins in the rat.
Amer. J. Anat. 104, 403-425.

Beck, F. (1979) Trypan blue teratogenesis. In: Advances in the study of birth defects.
Vol. 1. (ed. T.V.N. PERSAUD), MTS-Press, International Medical Publ., 37-51.

Beck, F., Lloyd, J.B. and Griffith, A. (1967) A histochemical and biochemical study of some aspects of placental function in the rat using maternal injection of horseradish peroxidase.
J. Anat. 101, 461-478.

Brambell, R.F.W. (1966) Transport across fetal membranes.
Cold Spr. Harb. Symp. quant. Biol. 13/3, 71-81.

Brown, J.A. and Segal, H.L. (1977) Effect of glucagon on pinocytosis by the yolk sac of the rat.
J. Biol. Chem. 252, 7151-7155.

Chadwick, C.S. and Nairn, R.C. (1960) Fluorescent protein tracer: The unreacted fluorescent material in fluorescein conjugates and studies of conjugates with other free fluorochromes.
Immunol. 3, 363.

Davis, H.W. and Sauter, R.W. (1977) Fluorescence of trypan blue in frozen-dried embryos of the rat. Histochemistry, 54, 177-189.

Dicon, F.J. and Maurer, P.H. (1955) Effects of large in fusions of heterologous serum proteins on the serum protein metabolism of the rabbit. J. Exp. Med. 101, 233-244.

Duncan, R. and Lloyd, J.B. (1978) Pinocytosis in the rat visceral yolk sac. Effects of temperature, metabolic inhibitors and some other modifiers. Biochim. Biophys. Acta 544, 647-655.

Duncan, R., Pratten, M.K. and Lloyd, J.B. (1979) Mechanism of polycation stimulation of pinocytosis. Biochim. Biophys. Acta 587, 463-475.

Ehrlich, P. (1892) Über Immunität durch Vererbung und Säugung. Z. Hyg. Infekt. Kr 12, 183-202.

Foote, C.L., Wesley, P.N. and Foote, F.M. (1954) Formation of the extraembryonic cavities of the hamster. Amer. J. Anat. 95, 291-307.

Franke, H., Gottschall, R. und Guder, H. (1977) Die Wirkung einer Überdosis Vitamin A auf die Eihaut der Ratte im letzten Graviditätsdrittel. Anat. Anz. 142, 49-54.

Freeman, S.J. and Lloyd, J.B. (1980) Differential uptake of a macromolecule by yolk sac and embryo of early rat conceptuses cultured in vitro. Biochem. Soc. Trans. 8, 434.

Gottschewski, G.H.M. (1962) Probleme der Frühentwicklung beim Säugetier.
Naturwissenschaftl. Rundschau 15, 257-264.

Gottschewski, G.H.M. und Zimmermann, W. (1961) Nachweis von mütterlichen Proteinen und TMV-Antikörpern in der Dottersackflüssigkeit von Kaninchenfruchtblasen zur Zeit der Nidation.
Naturwissenschaften 16, 557.

Graves, A.P. (1945) Development of the golden hamster, Cricetus auratus Waterhouse, during the first nine days.
Amer. J. Anat. 77, 219-251.

Gulamhusein, A.P. (1981) Trypan blue teratogenesis in the rat in vitro.
In: Culture techniques (eds. D. NEUBERT and H.-J. MERKER).
De Gruyter-Verlag, Berlin, 43-66.

Hamilton, W.J. and Samuel, D.M. (1956) The early development of the golden hamster (Cricetus auratus).
J. Anat. London 90, 395-416.

Hemmings, W.A. (1956) Protein selection in the yolk-sac splanchnopleur of the rabbit: the distribution of isotope following injections of 131J-labelled serum globulin into the uterine cavity.
Proc. Roy. Soc. (Biol.) 145, 186-195.

Huxham, M. and Beck, F. (1981) Receptor mediated coated vesicle transport of rat IgG across the 11.5 day in vitro rat yolk sac endoderm.
Cell. Biol. Int. Rep. 5, 1073-1981.

Ibbotson, G.E. and Williams, K.E. (1979) Rate of pinocytic capture of macromolecular substrates by rat yolk sac incubated in serum-free culture medium. Biochem. J. 178, 785-792.

Krzyzowska-Gruca, S. und Schiebler, T.H. (1967) Experimentelle Untersuchungen am Dottersackepithel der Ratte.
Z. Zellforsch. 79/2, 157-171.

Lambson, R.O. (1966) An electron microskopic visualisation of transport across rat visceral yolk sac. Amer. J. Anat. 118, 21-52.

Livesey, G. and Williams, K.E. (1979) Hydrolysis of an exogenous 125I-labelled protein by rat yolk sacs. Evidence for intracellular degradation within lysosomes.
Biochem. J. 184, 519-526.

Livesey, G., Williams, K.E., Knowles, S.E. and Ballard, F.J. (1980) Effects of weak bases on the degradation of endogenous and exogenous proteins by rat yolk sacs.
Biochem. J. 188, 895-903.

Livesey, G. and Williams, K.E. (1981) Rates of pinocytic capture of simple proteins by rat yolk sacs incubated in vitro.
Biochem. J. 198, 581-586.

Mayersbach, H. (1957) Immunohistologische Methoden I: Prinzipielle Ergebnisse und kritische Beobachtung zur Technik.
Acta Histochem. (Jena) 4, 260-275.

Mayersbach, H. (1958) Immunohistologische Methoden II: Ein weiterer Markierungsfarbstoff, 1-Dimethylnaphtylaminsulfonsäure-5.

Mayersbach, H. (1958) Zur Frage des Proteinüberganges von der Mutter zum Foeten. I. Befunde an Ratten am Ende der Schwangerschaft.
Z. Zellforsch. 48, 479-504.

Padykula, H.A., Deren, J.J. and Wilson, T.H. (1966) Development of structure and function in the mamalian yolk sac. I. Development morphology and Vit. B uptake of the rat yolk sac.
Develop. Biol. 13/3, 311-348.

Riggs, J.L., Seiwald, R.J., Burckhalter, J.H., Downs, C.M. and Metcalf, R.G. (1958) Isothiocyanate combounds as fluores-ent labelling agents for immune serum.
Amer. J. Path. 34, 1081-1092.

Roberts, A.V., Williams, K.E. and Lloyd, J.B. (1977) The pinocytosis of 125I-labelled poly (vinylpyrrolidone), (14C)sucrose and colloidal (198AU)gold by rat yolk sac cultured in vitro.
Biochem. J. 168, 239-244.

Roberts, G., Williams, K.E. and Lloyd, J.B. (1980) Mechanism of stimulation of pinocytosis by trypan blue.
Chem. Biol. Interact. 32, 305-310.

Schenk, R. (1957) Implantation und deciduale Reaktion in der Embryonalentwicklung des Goldhamsters (Mesocricetus auratus).
Z. Anat. 120, 75-94.

Schiller, A.A., Schayer, R.W. and Hess, E.L. (1953) Fluorescein-conjugated bovine albumin. J. Gen. Phys. 36, 489-506.

Schwick, H.G. (1965) Chemisch-entwicklungsphysiologische Beziehungen von Uterus zur Blastocyste des Kaninchens Oryctolagus cuniculus. Wilhelm Roux'Archiv Entwickl. Mech. Org. 156/3, 283-343.

Smith, A.E.S. and Schlechtmann, A.M. (1962) Significance of the rabbit yolk sac. A study of the passage of heterologous proteins from mother to embryo. Develop. Biol. 4, 339-360.

Thornburg, K.L. and Faber, J.J. (1977) Transfer of hydrophilic molecules by placenta and yolk sac of the guinea pig. Am. J. Physiol. 233, 111-124.

Thornburg, K.L. and Faber, J.J. (1979) The relative importance of the chorioallantoic and yolk-sac placentas for the transfer of hydrophilic materials and gamma-globulin in the guinea pig. In: Protein transmission through living membranes. Amsterdam, Elsevier/North-Holland, 31, 1-11.

Venable, J.H. (1946) Pre-implantation stages in the golden hamster (Cricetus auratus). Anat. Rec. 94, 105-120.

Ward, M.C. (1948) The early development and implantation of the golden hamster, Cricetus auratus, and the associated endometrial changes. Amer. J. Anat. 82, 231-275.

Ward Orsini, M.C. (1954) The trophoblastic giant cells and endovascular cells associated with the pregnancy in the hamster, Cricetus auratus. Amer. J. Anat. 94, 273-320.

Williams, E.W. (1978) Localization of protein in the rabbit yolk sac splanchnopleur by two methods of autoradiography. J. Microsc. 112, 319-329.

Wimsatt, W.A. (1949) Cytochemical observations on the fetal membranes and placenta of the bat myosie lucifufgus lucifufgus.

Wislocki, G.B. and Padykula, H.A. (1953) Reichert's membrane and the yolk sac of the rat investigated by histochemical means. Amer. J. Anat. 92, 117-151.

Zimmermann, W., Gottschewski, G.H.M., Flamm, H. und Kunz, Ch. (1963) Experimentelle Untersuchung über die Aufnahme von Eiweiß, Viren und Bakterien während der Embryogenese des Kaninchens. Develop. Biol. 6, 233-249.

Zimmermann, W. (1965) Eiperimentelle Untersuchungen über die Beziehungen zwischen Keim und Umwelt beim Kaninchen. Arzneim. Forsch. (Drug Rec.) 15, 1029-1035.

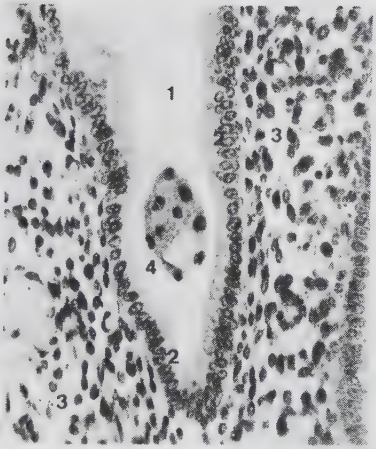
Zimmermann, W. (1966) Die Bedeutung der Nidation beim Säugetier für die immunologische Toleranz zwischen Mutter und Fet. Naturwissenschaftl. Rundschau 1/1, 18-21.

VII. ABBILDUNGEN

Abb. 1: (3 dpo) Frühe Blastozyste
(Bild: Dr. Zimmermann). Obj. 25

Abb. 2: (3,5 dpo) Blastozyste; Implantations-
krypte. Obj. 16/0,40

Erläuterungen: (1) Uteruslumen; (2) Uterusepithel;
(3) Decidua; (4) Blastozyste


1
3
4
2
3

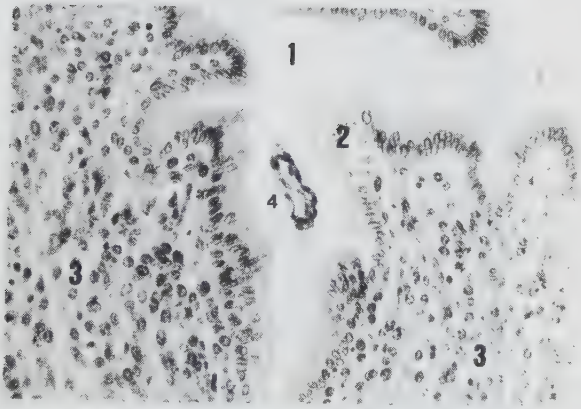
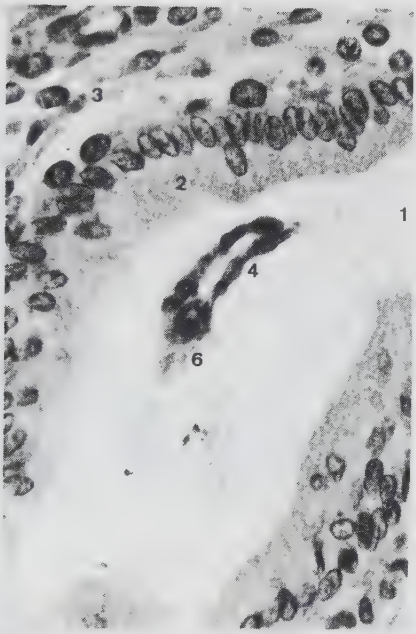

1
2
4
3
3

Abb. 3: (4 dpo) Blastozyste; Beginn des Implantationsprozesses; Trophoblast-Riesenzell-Bildung (6). Obj. 40/0,65

Abb. 4: (4,5 dpo) Beginnende Invasion der Riesenzellen; sichtbare Veränderungen in Decidua und Uterusepithel. Obj. 40/0,65

Erläuterungen: (1) Uteruslumen; (2) Uterusepithel; (3) Decidua; (4) Blastozyste; (5) Trophoblast; (6) Trophoblast-Riesenzelle


3
2
1
4
6

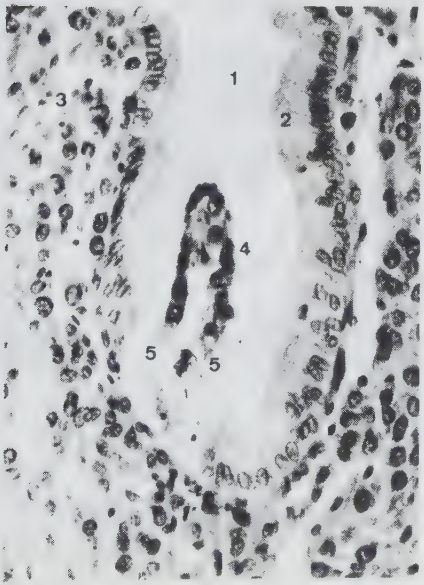
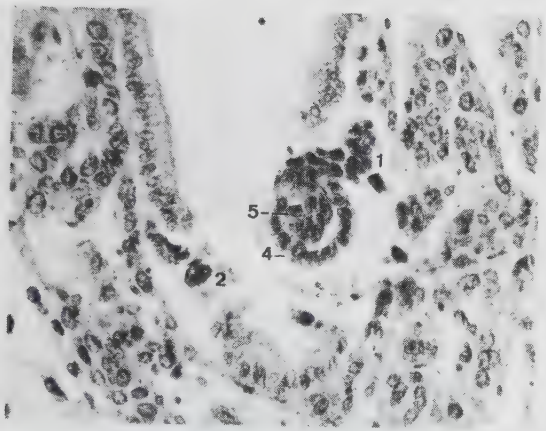

1
3
2
4
5
5

Abb. 5: (4,5 dpo) Implantierende Blastozyste; Differenzierung der Inneren Zellmasse; Bildung des Ektoplazentarkonus. Obj. 16/0,40

Abb. 6: (4,5 dpo) Blastozyste von Abb. 5; Trophoblastzellstränge lösen Unterusepithel von der Basalmembran ab (➡); Reichert'sche Membran deutlich sichtbar (▶); seitliche Zellstränge sind von der Reichert'schen Membran abgerissen (✱). Obj. 40/0,65

Erläuterungen: (1) Trophoblast; (2) Trophoblast-Riesenzelle; (3) Ektoplazentarkonus (4) Entoderm; (5) Ektoderm; (6) Reichert'sche Membran


1
5
4
2

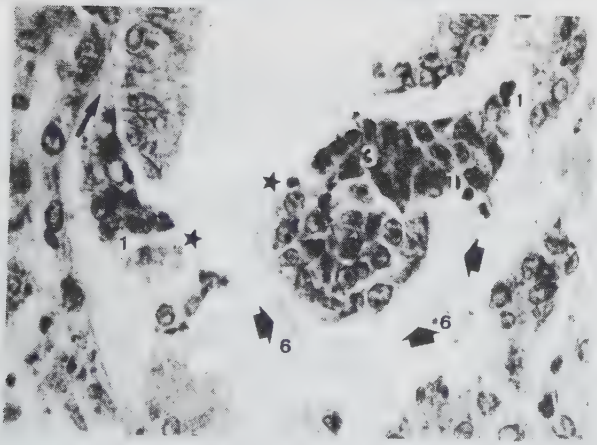
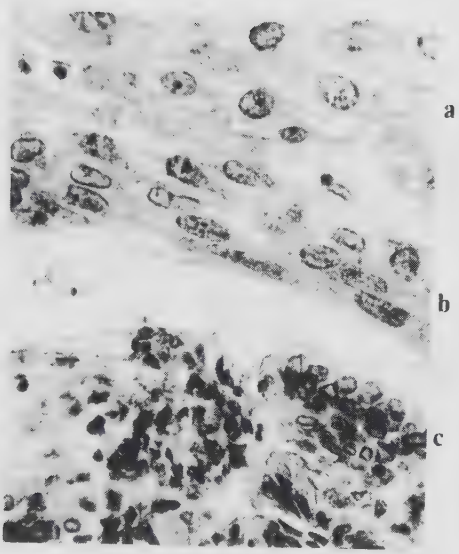

1
3
1
1
6
6

Abb. 7: (5 dpo) Die Schichten der Decidua capsularis:
a) äußere
b) mittlere } Schicht (s. Text)
c) innere

Abb. 8: (5 dpo) Abgeschlossene Implantation; Embryo allseitig von Decidua umgeben. Amnioektoplazentarhöhle mit primitiver Amnionfalte. Obj. 16/0,40

Erläuterungen: (3) Ektoplazentarkonus;
(7) Amnioektoplazentarhöhle;
(8) Primitive Amnionhöhle


a
b
c

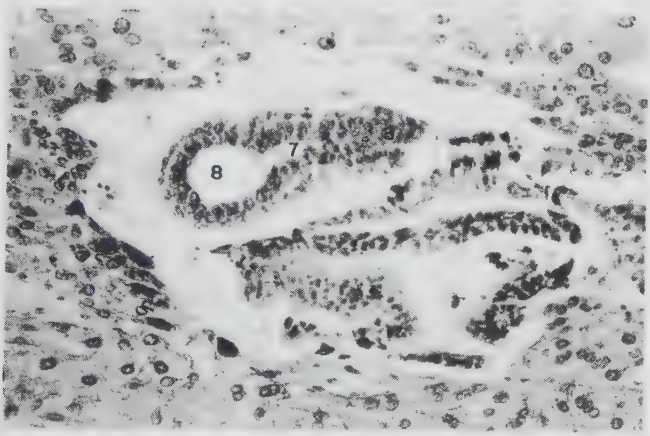
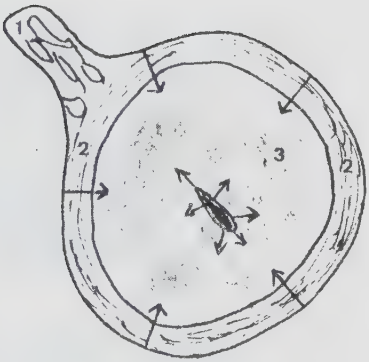

8
7

Abb. 9: Skizze eines Querschnittes durch den Uterus: Die Dottersackhöhle, die den Keim umgibt, ist schmal. Durch die Präparation (Fixieren, Dehydrieren. . .) schrumpft das Gewebe in Pfeilrichtung.

Abb. 10: Während des Schrumpfungsvorganges vergrößert sich die Dottersackhöhle (s. Text).

Erläuterungen: (1) Mesometrium; (2) Myometrium; (3) Decidua; (4) Dottersackhöhle; (5) Foet)


1
2
3
2

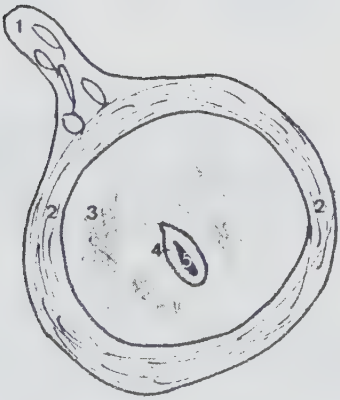
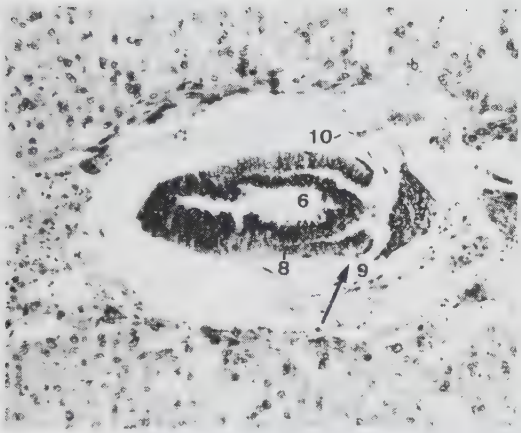

1
2
3
4
5
2

Abb. 11: (6 dpo) Gestreckte Amnioektoplazentarhöhle; distales Entoderm, das sich auf die Reichert'sche Membran fortzusetzen beginnt (⟶ 9). Obj. 10,/0,32

Abb. 12: (6 dpo) Zellnetz des Ektoplazentarkonus. Obj. 16/0,40

Erläuterungen: (6) Amnioektoplazentarhöhle; (7) Ektoplazentarkonus; (8) proximales Entoderm; (9) distales Entoderm; (10) Reichert'sche Membran


10
6
8
9

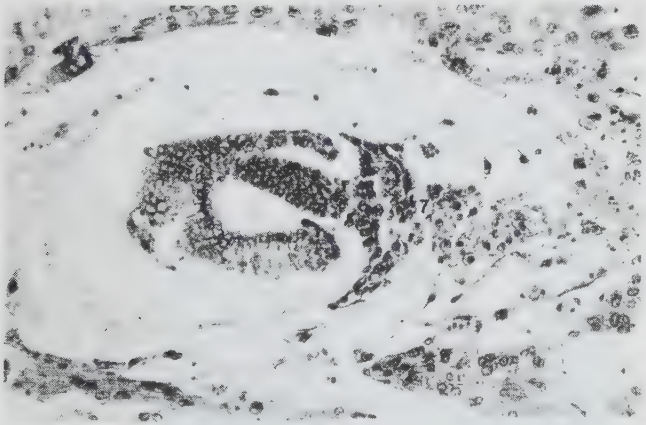

7

Abb. 13: (7 dpo) Distales (parietales) Entoderm findet man stellenweise an der Reichert' sche Membran (⟶), an den übrigen Stellen an das proximale (viscerale) Entoderm (⟵) fixiert (s. Text). Obj. 10/0,32

Abb. 14: (7,5 dpo) Querschnitt durch den Ektoplazentarkonus: Trophoblastzellstränge, die in Richtung Decidual profilieren. Obj. 2,5/0.08

Erläuterungen: (1) Reichert'sche Membran; (2) Decidua; (3) Trophoblastzellstränge; (4) distales Entoderm

4
1
4
1

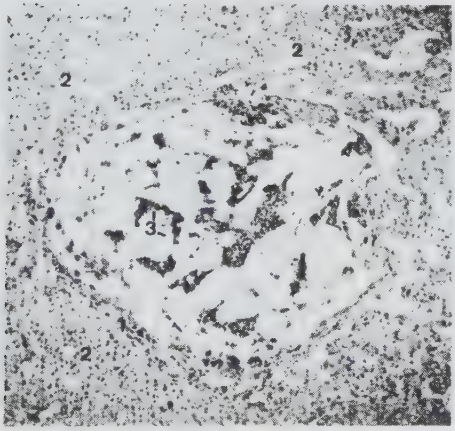

2
2
3
2

Abb. 15: (7,5 dpo) Fibroblastenähnliche Trophoblastzelle an der Reichert'schen Membran (⟶). Obj. 40/0,65

Abb. 16: (7,5 dpo) 1- und 2-kernige Trophoblast-Riesenzellen (⟵); innere Schicht der Decidua capsularis. Obj. 16/0,40

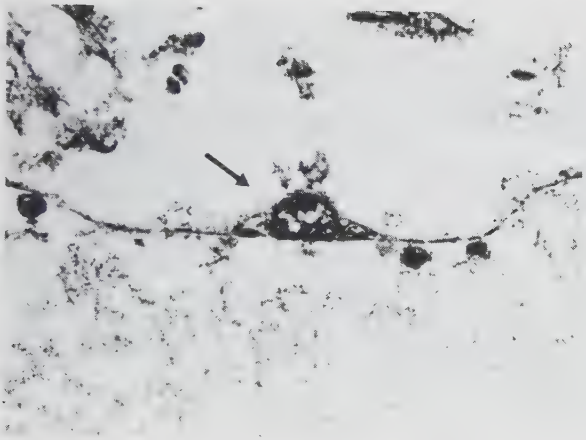


Abb. 17: (8 dpo) "Spitze" des Ektoplazentarkonus; Sternförmige Trophoblastzellen in Netzverband; Riesenzelle beim Eindringen in die Decidua capsularis (⟶); auch hier hat sich die innere Schicht von der mittleren abgelöst (**). Obj. 10/0,32

Abb. 18: (7,5 dpo) Vergrößerung aus Abb. 14: Trophoblastzellstränge dringen in die Decidua ein (⟶); innere Deciduaschicht zeigt stellenweise das Bild eines degenerierenden Gewebes (◀). Obj. 10/0,32

Erläuterungen: (1) Decidua; (2) Trophoblastzellverband

1
1

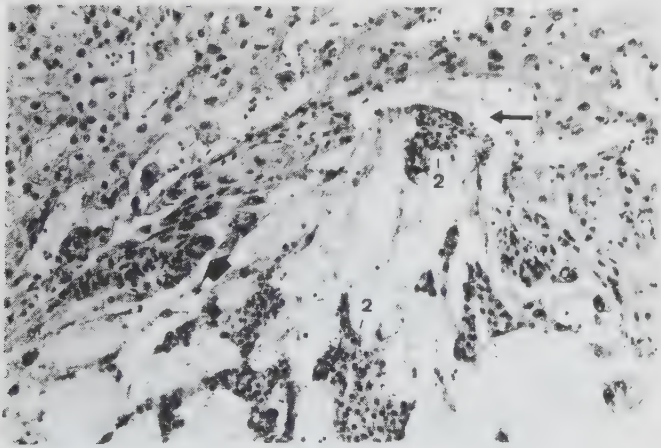
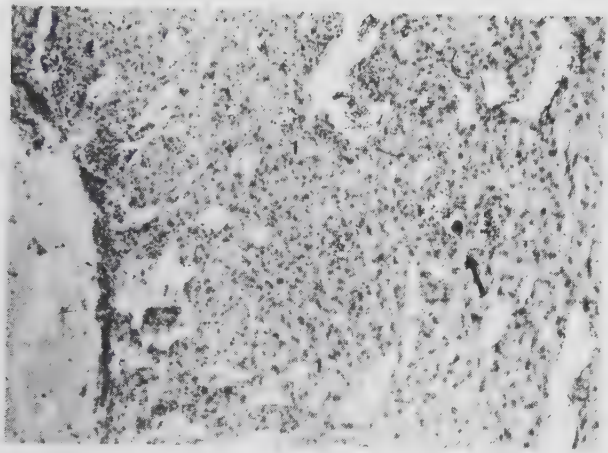

1
2
2

Abb. 19: (7 dpo) Trophoblast-Riesenzelle tief in der Decidua (⟵). Obj. 6,3/0,08

Abb. 20: (6,5 dpo) Entstehung des Exocoels; hier noch als ringförmige Höhle ($\overset{8}{**}$); Mesoderm breitet sich in ventraler und dorsaler Richtung aus ($\xrightarrow[7]{}$). Obj. 10/0,32

Erläuterungen: (1) Decidua; (3) Deciduahöhle; (4) Reichert'sche Membran; (5) Entoderm; (6) Ektoderm; (7) Mesoderm; (8) Exocoel


1

4
8
8
6
7
5
4

Abb. 21: (6,5 dpo) Im Zentrum des Keimes verwächst die innere Wand des primitiven Exocoels (⟶); Trennung der Amnioektoplazentarhöhle in die ventrale Amnion- und die dorsale Ektoplazentarhöhle. Obj. 10/0,32

Abb. 22: (7 dpo) sind die definitiven Keimeshöhlen in ihrer Grundgestalt festgelegt. Obj. 6,3/0,20

Erläuterungen: (1) Amnionhöhle; (2) Exocoel; (3) Ektoplazentarhöhle; (4) Dottersackhöhle; (5) Amnion; (6) Chorion

4
1
2
3
2
4
4

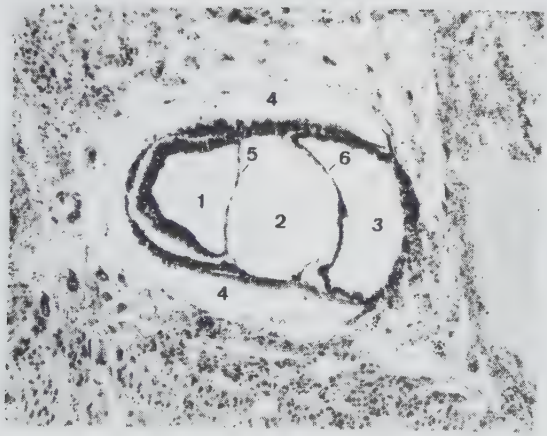
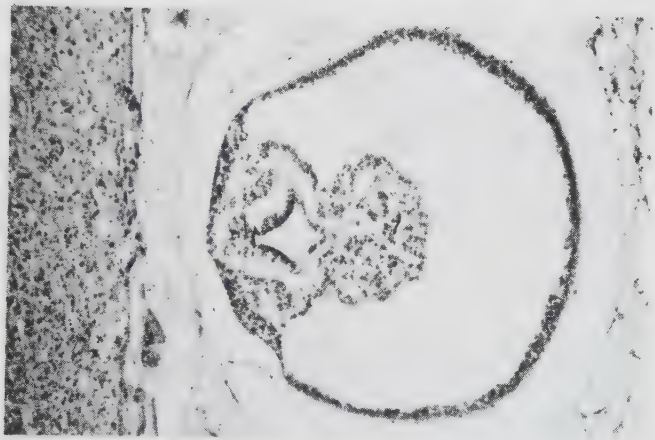

4
5
6
1
2
3
4

Abb. 23: (7,25 dpo) Aussprossung der Allantois. Obj. 6,3/0,20

Abb. 24: (7,25 dpo) Querschnitt durch einen Somiten; seitlich bildet sich das embryonale Coelom (**). Obj. 6,3/0,20

Erläuterungen: (1) Amnionhöhle; (2) Exocoel; (3) Ektoplazentarhöhle; (5) Amnion; (6) Chorion; (7) Allantois



5
6
1
2
3

Abb. 25: (8 dpo) Schwanzende des Keimes mit Allantois, die sich auf die Basis des Ektoplazentarkonus ausbreitet (Plazentabildung); das Chorion ist zentral mit der Basis verwachsen, die Ektoplazentarhöhle zur ringförmigen reduziert (**). Obj. 2,5/0,08

Abb. 26: (8 dpo) Kopfende des Keimes mit Herzanlage (⟶) und angeschnittenem Kopfdarm (**). Obj. 2,5/0,08

Erläuterungen: (1) Ecocoel; (2) Allantois; (3) Decidua

1
2
3

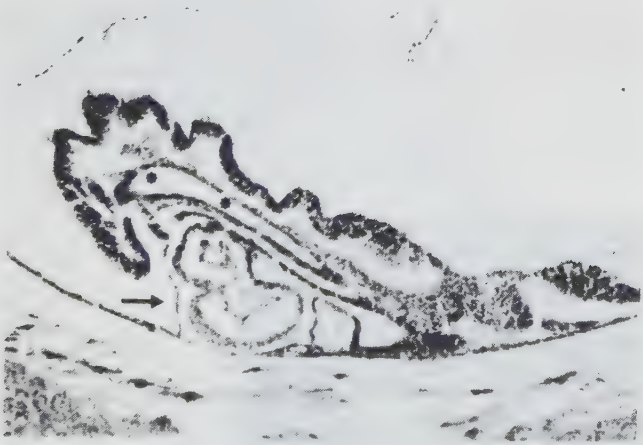
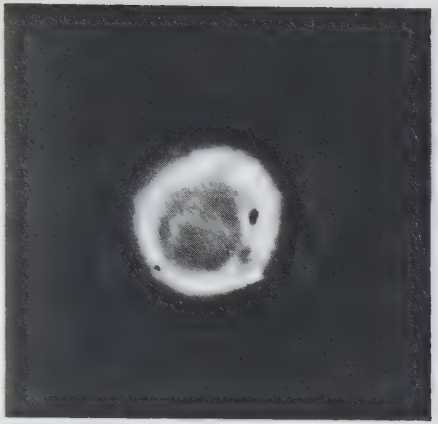


Abb. 27: Blutgefäße des Uterus nach der Injektion des FITC: Eigenfluoreszenzen im Gewebe, "Brilliant"-Fluoreszenz im Lumen der Gefäße.

Abb. 28: (3 dpo) a) Normallichtaufnahme einer fixierten Blastozyste (mit Membrana pellucida), b) UV-Aufnahme der selben Blastozyste: Fluoreszierendes Eiweiß ist in den perivitellinen Raum eingedrungen. Die Zellen sind frei von Fluoreszenz.



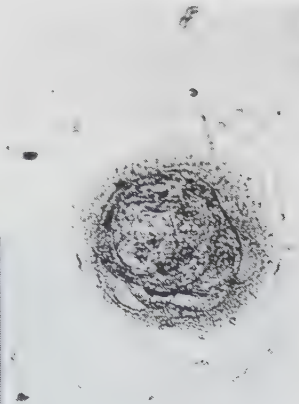
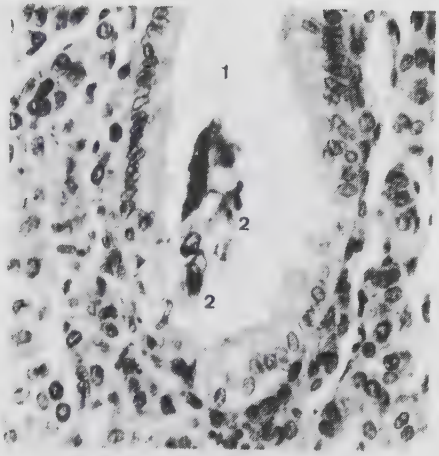


Abb. 29: (4,5 dpo) a. Normallichtaufnahme: Blastozyste in der Implantationskrypte; beginnende Implantationsphase.

b. UV-Aufnahme: Fluoreszierende Trophoblast-Riesenzelle. Obj. 40/0,65

Erläuterungen: (1) Uteruslumen;
(2) Trophoblast-Riesenzelle


1
2
2

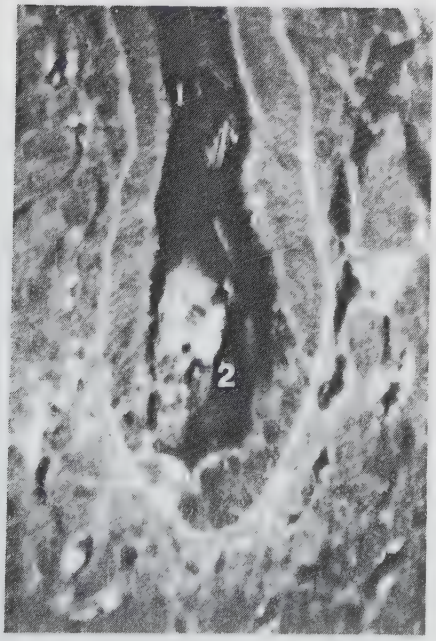
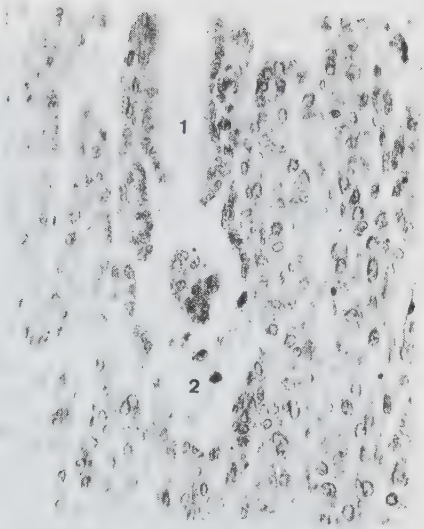

1
2

Abb. 30: (4,5 dpo) a. Normallichtaufnahme einer Blastocyste während der Implantation.

b. UV-Aufnahme: Fluoreszierende Vakuolen in den Trophoblast-Riesenzellen; Entoderm und Ektoderm frei von Fluoreszenz.
Obj. 16/0,40

Erläuterungen: (1) Uteruslumen;
(2) Trophoblast-Riesenzelle


1
2

1
2

Abb. 31: (4,5 dpo) Nebenbefunde: s. Text
Uterusepithel zwischen Implantationsorten. Obj. 16/0,40

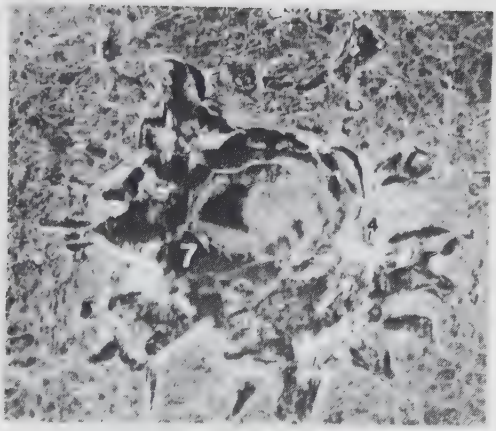
Abb. 32: (4,5 dpo) Nebenbefunde: s. Text
Uterusquerschnitt an einem Implantationsort. Obj. 6,3/0,20

Erläuterungen: (1) Uteruslumen; (2) Uterusepithel;
(3) Blastozyste

Abb. 33: (5,5 dpo) Implantierender Keim; die Keimeshöhlen sind frei von Fluoreszenz; Eiweißaufnahme nur durch Trophoblast-Riesenzellen. Obj. 10/0,32

Abb. 34: (6,5 dpo) Beginnende Durchlässigkeit der Reichert'schen Membran: Fluoreszierende Vakuolen in den Zellen des parietalen Entoderm (Dottersackepithel). Obj. 10/0,32

Erläuterungen: (4) Trophoblast-Riesenzelle;
(5) Reichert'sche Membran;
(6) parietales Entoderm
(7) Dottersackhöhle


10
7

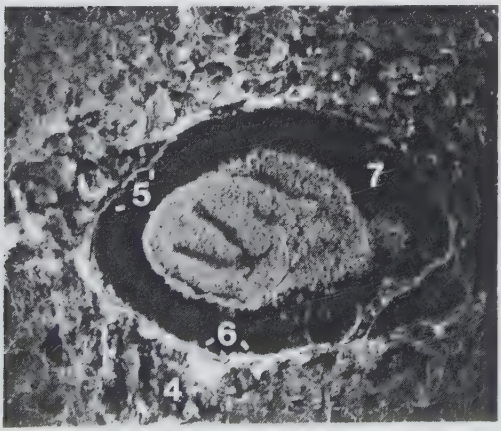
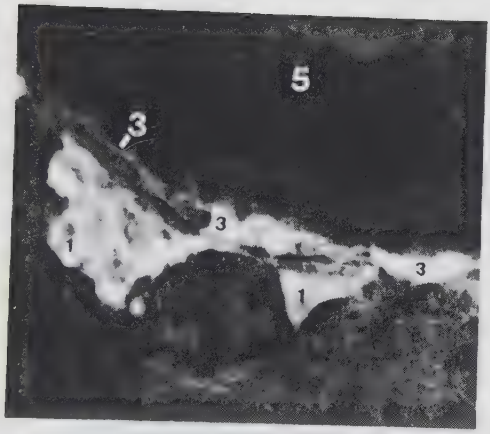

5
7
6
4

Abb. 35: (6,5 dpo) Ausschnitt aus Abb. 34
Neben den Trophoblastzellen fluoreszieren Zellen des parietalen Entoderm.
Obj. 40/0,65

Abb. 36: (7 dpo) Fluoreszierende Proteinkomplexe im Raum zwischen dem visceralen und parietalen Entoderm (Dottersack). Obj. 6,3/0,20

Erläuterungen: (1) Trophoblast-Riesenzelle;
(2) Reichert'sche Membran;
(3) parietales Entoderm;
(5) Dottersackhöhle
(7) Exocoel; (8) Mesoderm;
(9) Ektoderm


5
3
3
1
3
1

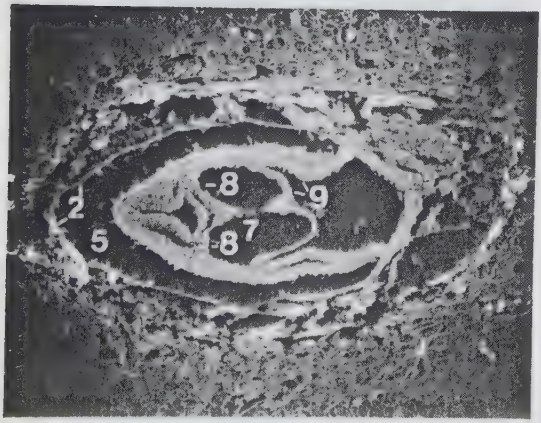

8
9
2
5
8
7

Abb. 37: (7 dpo) Fluoreszierendes Eiweiß, daß dem visceralen Entoderm angelagert ist (nicht intrazellulär). Obj. 40/0,65

Erläuterungen: (4) viscerales Entoderm;
(5) Dottersackhöhle;
(6) markiertes Eiweiß

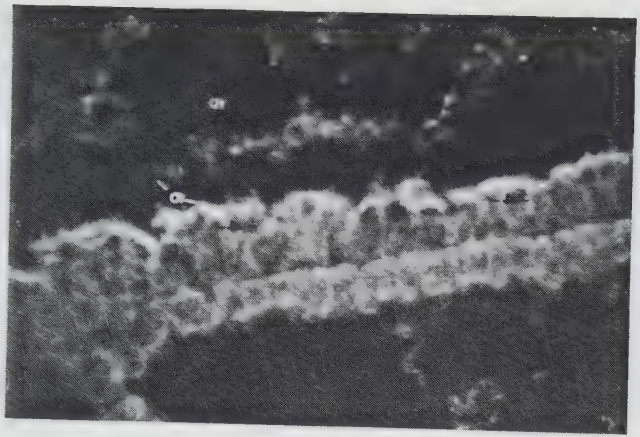
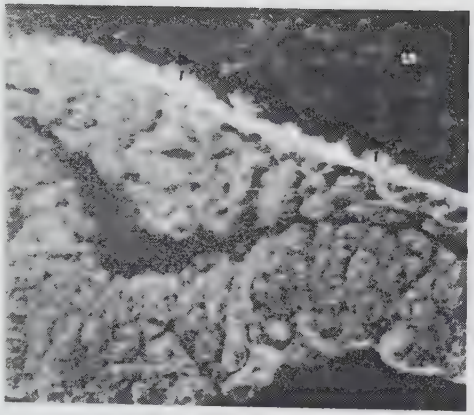
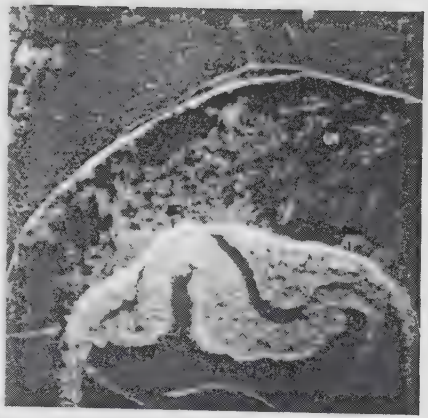


Abb. 38: (7,5 dpo) Beginnende intrazelluläre Resorption des markierten Eiweißes durch das viscerale Entoderm; besonders intensiv im Bereich des zukünftigen Urdarmes. Obj. 10/0,32

Abb. 39: (7,5 dpo) Aufnahme des markierten Eiweißes durch das viscerale Entoderm; - keine Anzeichen eines transzellulären Tranzportes: Mesoderm und Ektoderm sind frei von spezifischer Fluoreszenz. Obj. 40/0,65

Erläuterungen: (4) viscerales Entoderm;
(5) Dottersackhöhle





Lebenslauf

1946	28. Januar, geboren in Dessau
1951 - 1956	Besuch der Grundschule
1956 - 1965	Besuch des Gymnasiums, Leibniz-Schule in Rottweil
1965	Februar, Abitur
1966 - 1972	Medizinstudium in Tübingen und Berlin
1973	November, Approbation
1974 - 1979	Assistenzarzt in der Chirurgischen Abteilung, Krankenhaus am Urban, Berlin
1980 - 1981	Arzt in Nicaragua
1982	Arzt in der Orthopädischen Abteilung des Goldenbühl-Krankenhauses in Villingen
1983 - 1984	Arzt in der Inneren Abteilung des Kreiskrankenhauses Rottweil